



Tesis Doctoral

EVALUACIÓN *IN SITU* DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE LA CLORHEXIDINA
AL 0,20%, ADMINISTRADA EN ENJUAGUES
A DIFERENTES POSOLOGÍAS

Seila María Torres Landín

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA
2015





Tesis Doctoral

EVALUACIÓN *IN SITU* DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE LA CLORHEXIDINA
AL 0,20%, ADMINISTRADA EN ENJUAGUES
A DIFERENTES POSOLOGÍAS

Firmado: Seila María Torres Landín

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA
2015



AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES

Dr. Pedro Diz Dios, profesor del Departamento de Estomatología de la Universidad de Santiago de Compostela

Dra. Inmaculada Tomás Carmona, profesora del Departamento de Estomatología de la Universidad de Santiago de Compostela

Como Directores de la Tesis Doctoral titulada “EVALUACION *IN SITU* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA CLORHEXIDINA AL 0,20%, ADMINISTRADA EN ENJUAGUES A DIFERENTES POSOLOGÍAS” presentada por la Licenciada en Odontología Dña. Seila María Torres Landín

Autorizan la presentación de la tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado, y como Directores de la misma consideran que no incurre en causas de abstención establecidas en la ley 30/1992.

Dr. P. Diz Dios

Dra. I. Tomás Carmona

Santiago de Compostela, septiembre de 2015



Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a los directores de esta tesis, los profesores Pedro Diz e Inmaculada Tomás, por haberme brindado la oportunidad de desarrollar este proyecto, por dirigirlo de forma encomiable y por su paciencia inagotable. De forma especial, quisiera expresar mi gratitud a Lucía García-Caballero, por la generosidad que ha demostrado al transmitirme su experiencia sobre este tema y porque su tesis doctoral ha representado un referente imprescindible. También es ineludible reconocer el trabajo de Mercedes Rivas Cascallar (técnica de microscopía confocal) y de Isabel Martínez (especialista en bioestadística). No quisiera dejar de mencionar a los participantes en el estudio por su colaboración desinteresada, y a todos los compañeros de la Unidad de Pacientes Especiales por su constante apoyo y disponibilidad.

También me gustaría agradecer esta tesis a mi familia. A mi madre, por ser siempre incondicional y porque sus buenos consejos que me guiaron durante toda mi vida. A mi padre, por haberme enseñado que con esfuerzo, trabajo y constancia todo se consigue. A Silvia, Touri y Candela por el apoyo que me brindan día a día. A mis amigos, compañeras de trabajo y familiares por estar siempre que los necesito. A Javi, a él le dedico especialmente esta Tesis, por su comprensión y apoyo, por entender mis malos momentos y sobre todo porque me equilibra cuando más lo necesito. Y por último, a Elba, porque tu llegada coincidió con el final de este trabajo y me ayudaste a darle el empujón necesario para terminarlo.

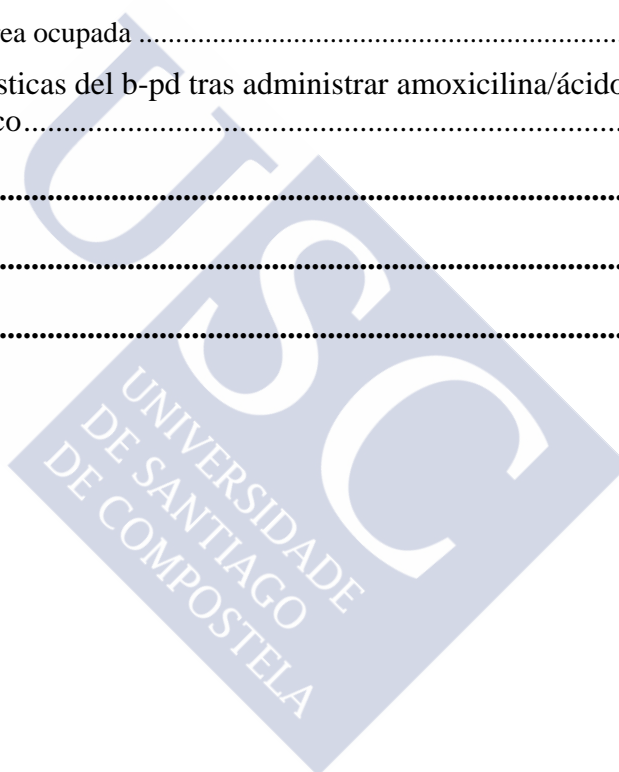


ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. EL BIOFILM ORAL	15
1.1.2. Propiedades del biofilm oral	17
1.1.3. Agentes anti-biofilm oral	19
1.1.3.1. Agentes antibacterianos inespecíficos.....	19
1.1.3.2. El papel regulador de las adhesinas	21
1.1.3.3. Inhibidores de las enzimas sortase	21
1.1.3.4. Inhibidores del <i>quorum sensing</i>	23
1.1.3.5. Péptidos antimicrobianos sintéticos	23
1.2. INFECCIONES PRODUCIDAS POR EL BIOFILM ORAL	25
1.2.1. Infecciones locales	25
1.2.1.1. Caries y enfermedad periodontal	25
1.2.1.2. Alveolitis.....	26
1.2.2. Infecciones focales.....	29
1.2.2.1. Endocarditis bacteriana y otras enfermedades cardiovasculares...	29
1.2.2.2. Infecciones respiratorias	32
1.3. PROFILAXIS ANTIMICROBIANA DE LAS INFECCIONES PRODUCIDAS POR EL BIOFILM ORAL	37
1.3.1. Profilaxis de las infecciones locales	37
1.3.1.1. Profilaxis de la alveolitis con clorhexidina	37
1.3.1.2. Profilaxis de la alveolitis con antibióticos	44
1.3.2. Profilaxis de las infecciones focales	49
1.3.2.1. Profilaxis de las infecciones cardiovasculares de origen oral con clorhexidina	49
1.3.2.2. Profilaxis de las infecciones cardiovasculares de origen oral con antibióticos sistémicos	54
1.3.2.3. Profilaxis de las infecciones respiratorias de origen oral (neumonía nosocomial asociada a ventilación mecánica) con clorhexidina	57
1.3.2.4. Profilaxis de las infecciones respiratorias de origen oral (neumonía nosocomial asociada a ventilación mecánica) con antibióticos	63
2. OBJETIVOS.....	69
3. MATERIAL Y MÉTODOS	73

3.1. SELECCIÓN DEL GRUPO DE ESTUDIO	75
3.2. COLECCIÓN Y ANÁLISIS DEL BIOFILM DE PLACA DENTAL	75
3.2.1. Confección de una férula porta-discos individualizada	75
3.2.2. Intervenciones sobre la formación del biofilm	78
3.2.3. Procesamiento y análisis de las muestras.....	79
4. RESULTADOS	83
4.1. GROSOR DEL BIOFILM DE PLACA DENTAL (B-PD)	85
4.1.1. Grosor del B-PD basal	85
4.1.2. Grosor del B-PD tras administrar clorhexidina 0,20% cada 12 horas durante 4 días	85
4.1.3. Grosor del B-PD tras administrar clorhexidina 0,20% cada 8 horas durante 4 días	86
4.1.4. Grosor del B-PD tras administrar amoxicilina-ácido clavulánico (500/125 mg) cada 8 horas durante 4 días	88
4.2. VITALIDAD BACTERIANA DEL BIOFILM DE PLACA DENTAL ..	89
4.2.1. Vitalidad bacteriana del B-PD basal	89
4.2.2. Vitalidad bacteriana del B-PD tras administrar clorhexidina 0,20% cada 12 horas durante 4 días	90
4.2.3. Vitalidad bacteriana del B-PD tras administrar clorhexidina 0,20% cada 8 horas durante 4 días	92
4.2.4. Vitalidad bacteriana del B-PD tras administrar amoxicilina/ácido clavulánico 500/125 mg cada 8 horas durante 4 días.....	93
4.3. ÁREA OCUPADA POR EL BIOFILM DE PLACA DENTAL	97
4.3.1. Área ocupada por el B-PD basal	97
4.3.2. Área ocupada por el B-PD tras administrar clorhexidina 0,20% cada 12 horas durante 4 días.....	97
4.3.3. Área ocupada por el B-PD tras administrar clorhexidina 0,20% cada 8 horas durante 4 días.....	98
4.3.4. Área ocupada por el B-PD tras administrar amoxicilina-ácido clavulánico (500/125 mg) cada 8 horas durante 4 días	100
5. DISCUSIÓN	101
5.1. DISCUSIÓN DE LA METODOLOGÍA	103
5.1.1. Aparatos removibles porta-discos para recoger el B-PD	103
5.1.2. Sustratos para recoger el B-PD	104
5.1.3. Período de formación del B-PD	105

5.1.4. Técnicas de fluorescencia	106
5.1.5. Microscopía confocal de barrido por láser.....	107
5.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	111
5.2.1. Características del b-pd basal.....	111
5.2.1.1. Grosor	111
5.2.1.2. Vitalidad.....	113
5.2.1.3. Área ocupada	115
5.2.2. Características del b-pd tras administrar clorhexidina 0,20%	115
5.2.2.1. Grosor	116
5.2.2.2. Vitalidad.....	116
5.2.2.3. Área ocupada	118
5.2.3. Características del b-pd tras administrar amoxicilina/ácido clavulánico.....	119
6. CONCLUSIONES	123
7. BIBLIOGRAFÍA	127
8. RESUMEN	165







1. INTRODUCCIÓN



1.1. EL BIOFILM ORAL

1.1.1. Formación y estructura del biofilm oral

Las formas más habituales de presentación de las bacterias en la naturaleza son las biopelículas (*Barcat, 2005*), formaciones de agregados bacterianos embebidos en una matriz polimérica y adheridos a una superficie (*Costerton et al, 1999*). Técnicamente se han denominado *biofilms*, término que emplearemos en lo sucesivo por su mayor difusión en el ámbito científico. Las bacterias sésiles del biofilm presentan un fenotipo alterado en términos de índice de crecimiento y expresión genética con respecto a sus equivalentes planctónicas (*Donlan y Costerton, 2002*) y este sistema organizativo puede llegar a ser hasta 500 veces más resistente a la acción de determinados agentes antimicrobianos (*Pratten y Wilson, 1999*).

La placa dental es una comunidad microbiana compleja que crece sobre la superficie del esmalte dentario (*Li et al, 2004*). Probablemente representa la expresión de biofilm especializado más estudiada de todas las que se han descrito en el ser humano (*Slavkin, 1997*), y constituye el principal agente etiológico de la caries y de la enfermedad periodontal (*Fine, 1988*).

En general, la formación del biofilm es un proceso que se desarrolla en dos etapas bien diferenciadas: comienza con la adhesión de las bacterias a una superficie (etapa de adhesión), y continúa con la proliferación y diferenciación de la unión celular (etapa de maduración) (*Rozen et al, 2001*); este proceso está controlado por las adhesinas de superficie y por la comunicación entre las células bacterianas que conforman el propio biofilm.

La etapa de adhesión se inicia con la adsorción de determinadas especies microbianas de la cavidad oral a la película de proteínas que recubre la superficie del diente película adquirida del esmalte (*Yao et al, 2003*). Estos colonizadores primarios aportan un sustrato imprescindible para la incorporación de los siguientes colonizadores, determinando así las fases posteriores de formación del biofilm (*Li et al, 2004*). Hay dos reacciones intercelulares que cobran entonces una especial relevancia: la coagregación y la coadhesión (*Foster y Kolenbrander, 2004*). La coagregación es el reconocimiento entre bacterias genéticamente diferentes que coexisten en una suspensión planctónica, mientras que la coadhesión es el reconocimiento mutuo entre una célula planctónica y otra sésil. Algunas bacterias coagregadas de especial interés en la cavidad oral -como determinados *Streptococcus spp.*-, se adhieren fácilmente a las superficies

acondicionadas por la saliva, favorecen la agregación de otras especies bacterianas y facilitan las relaciones simbióticas (*Foster y Kolenbrander, 2004*).

Con la adhesión de cada nueva especie bacteriana, se genera una nueva superficie que favorece la adhesión de otras bacterias, resultando en una progresión de superficies y de cambios, inherentes a la heterogeneidad de las especies implicadas. Esta dinámica de crecimiento y adhesión, confirma la existencia de comunicación inter- e intraespecies (*Kolenbrander et al, 2002*).

En el proceso de formación del biofilm oral se han descrito 5 fases bien diferenciadas (*Marsh, 2004*):

- ✓ *La formación de la película adquirida.* Consiste en el recubrimiento acelular de la superficie del esmalte por elementos de la saliva mucina, glicoproteínas, proteínas ricas en prolina, histidina y enzimas (*Frías y Alsina, 2001*), así como por constituyentes bacterianos como la fructosiltransferasa o la glucosiltransferasa, que representan una importante fuente de receptores para los colonizadores primarios (*Kolenbrander et al, 2002*).
- ✓ *La adhesión de colonizadores primarios.* Los principales géneros bacterianos pioneros son *Streptococcus spp.* y *Actinomyces spp.* (*Kolenbrander, 2000*). Los *Streptococcus spp.* representan el 60-90% de las bacterias que colonizan el diente en las primeras horas después de efectuar una remoción mecánica profesional de la placa, y dentro de este género destacan por su frecuencia las especies *mitis*, *sanguinis*, *oralis* y *gordonii* (*Kolenbrander et al, 1999*). Aunque su relevancia es menor, también se consideran colonizadores pioneros: *Capnocytophaga spp.*, *Eikenella spp.*, *Haemophilus spp.*, *Prevotella spp.* y *Veillonella spp.* (*Kolenbrander et al, 2002*). El ensamblaje entre estas bacterias pioneras y la película salival que recubre la superficie del esmalte se denomina “película de unión” (*Busscher et al, 1995*).
- ✓ *La coadhesión de colonizadores tardíos.* Las bacterias de la flora oral se conectan mediante polisacáridos (*Bowden y Li, 1997*), que actúan como auténticos mecanismos de cooperación (*Kolenbrander et al, 2002*). A medida que la placa va madurando, se incrementa la población de microorganismos Gram-negativos (*Landa et al, 1997*), entre los que cabe destacar *Fusobacterium nucleatum*, ya que puede coadherirse tanto a los colonizadores pioneros como a los tardíos.
- ✓ *Fase de proliferación bacteriana.* En esta fase, los microorganismos adheridos se multiplican por un proceso de división celular. Es en este momento cuando se produce la coagregación selectiva con otras

especies bacterianas (*Socransky y Haffajee, 2002*) y cuando se conforma definitivamente la compleja matriz extracelular.

- ✓ *Estabilidad y desprendimiento.* El biofilm es finalmente mucho más estable, de naturaleza mixta, está espacialmente organizado y es funcional. Las bacterias adheridas, en respuesta a los estímulos ambientales, pueden desprenderse y colonizar nuevos hábitats, hasta formar un nuevo biofilm de características similares al original (*Socransky y Haffajee, 2002*).

La “arquitectura del biofilm” se define como un patrón delimitado espacialmente y compuesto por una distribución variable de microcolonias bacterianas y agregados celulares envueltos en una matriz densa de exopolisacáridos, surcados por canales abiertos de agua que permiten el paso de nutrientes y la salida de desechos (*Stewart, 2003; Barcat, 2005*). La manipulación de esta estructura morfológica puede alterar la transferencia de masa líquida al conjunto del biofilm y puede facilitar el acceso a los agentes terapéuticos (*Robinson et al, 2006*). En la placa dental se reproduce la arquitectura de los biofilms generados *in vitro* (*Wood et al, 2000; Zaura-Arite et al, 2001*), con canales y poros tapizados por material celular muerto por los que se incorporan nutrientes especialmente sustratos endógenos a los que acceden directamente los microorganismos vivos (*Socransky y Haffajee, 2002*) por un proceso de difusión simple (*Stewart, 2003*).

1.1.2. Propiedades del biofilm oral

- ✓ *Resistencia a antimicrobianos.* La susceptibilidad reducida de las bacterias de la placa dental a los agentes antimicrobianos en comparación con sus equivalentes planctónicas, probablemente constituye su propiedad más relevante (*Pratten y Wilson, 1999*). Para explicar este fenómeno se han esgrimido numerosas hipótesis, como: la densidad de las microcolonias, y las interacciones entre células y matriz (*Wood et al, 2000*); interacciones iónicas o reacciones químicas entre la matriz extracelular y el agente antimicrobiano teoría de la difusión-reacción (*Marsh, 2005*); el ritmo lento de crecimiento de las bacterias que conforman la placa dental (*Costerton et al, 1999*); la edad del biofilm, ya que las estructuras maduras ofrecen mayor resistencia a los agentes antimicrobianos que los biofilms jóvenes (*Millward y Wilson, 1989*); el microambiente desfavorable de las profundidades del biofilm o la capacidad de la matriz para atrapar enzimas neutralizadoras (*Gilbert et al, 2002*); por último, también se ha sugerido que podría responder a la expresión de un fenotipo de resistencia a los antimicrobianos, compartido entre las bacterias que forman parte de un mismo biofilm (*Socransky y Haffajee, 2002*).

- ✓ *Expresión genética alterada.* Las bacterias planctónicas de un cultivo puro monoespecie son fenotípicamente muy diferentes de las que crecen en un biofilm aunque compartan el mismo genotipo y por lo tanto también diferirán en términos de actividad metabólica, adhesión y resistencia a los antimicrobianos (Costerton y Lewandowski, 1997). La plasticidad estructural y funcional de las bacterias, les permite adaptaciones fenotípicas rápidas en base a la disponibilidad de nutrientes, ritmo de crecimiento, condiciones ambientales como la temperatura y el pH, o exposición a concentraciones subterapéuticas de antimicrobianos. El fenotipo modificado puede incorporar modificaciones de la membrana o de la matriz extracelular (Gilbert et al, 1997).
- ✓ *El quorum sensing.* La comunicación entre microorganismos *quorum sensing* es esencial para la colonización inicial y la posterior formación de la placa dental (Kolenbrander et al, 2002). Los mecanismos de comunicación son básicamente dos: por medio de señales químicas (Jayaraman y Wood, 2008) o intercambiando material genético (Marsh, 2005). En el primero, el receptor transmembrana histidín-quinasa actúa como un sensor para la adaptación al entorno biológico del biofilm (Scheie y Petersen, 2004) y se ha confirmado que existe tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. Con respecto al intercambio de material genético, la comunicación interbacteriana se lleva a cabo a través de la difusión de pequeñas moléculas denominadas autoinductores (Marsh, 2004), que en situaciones de estrés ambiental hacen que las bacterias modifiquen su expresión genética para optimizar sus factores de virulencia, aumentar su supervivencia y facilitar su proliferación (Jayaraman y Wood, 2008); en el contexto de la cavidad oral, muchos *Streptococcus spp.* y algunos patógenos periodontales *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum* (Frias et al, 2001) se comunican por medio del *quorum sensing* (Scheie y Petersen, 2004).
- ✓ *Heterogeneidad fisiológica.* El biofilm oral es multiespecie y está conformado por bacterias que ocupan micronichos entre los que existen interacciones físicas, metabólicas y moleculares, imprescindibles para la adhesión, el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos, incluso en ambientes hostiles (Marsh, 2004). Esta distribución en nichos, explica la coexistencia de bacterias con requerimientos metabólicos contradictorios y además proporciona otras ventajas, entre las que destacan: la coexistencia de especies con un rango muy amplio de necesidades para su crecimiento, permitiendo por ejemplo que determinadas bacterias consumidoras de oxígeno como *Neisseria spp.* creen unas condiciones ambientales adecuadas para la colonización de anaerobios estrictos (Bradshaw et al, 1996); una mayor eficacia metabólica, que permite la degradación de determinadas macromoléculas complejas del

huésped, resistentes a la acción de las bacterias aisladas (*Bradshaw et al, 1994*); un aumento de la resistencia a las agresiones del entorno, los antimicrobianos y los mecanismos de defensa del huésped (*Marsh, 2005*); y un “sinergismo patogénico”, que aúna diferentes factores de virulencia (*van Steenbergen et al, 1984*).

- ✓ **Capacidad adaptativa.** Como hemos señalado, para mantener la estructura y la tasa de crecimiento del biofilm es imprescindible una gran capacidad de adaptación morfológica y fisiológica, que permita responder adecuadamente a las agresiones ambientales (*Serrano-Granger y Herrera, 2005*). En condiciones extremas, las bacterias empaquetan su ADN, minimizan su metabolismo y llegan a reducir su tamaño hasta dos tercios, iniciando un estado de latencia que puede perdurar durante años, lo cual justificaría la discrepancia en términos de sensibilidad antimicrobiana cuando estas bacterias están en estado letárgico o en estado activo (*ten Cate, 2006*). Cuando vuelve a optimizarse el ambiente, con nutrientes en cantidades adecuadas y buenas condiciones de pH y temperatura, las bacterias desempaquetan su ADN y reinician su actividad (*Slavkin, 1997*).

1.1.3. Agentes anti-biofilm oral

Existe una relación fundamental entre la estructura del biofilm y su función *in situ* (*Costerton et al, 1995*). Una vez formada, la placa dental se mantiene estable gracias a la denominada homeostasis microbiana, que es el resultado de un balance dinámico en las interacciones microbianas de sinergismo y antagonismo (*Sanders y Sanders, 1984*). La homeostasis se puede alterar, produciéndose cambios en la composición de la microflora que podrían inducir la aparición de patología (*Marsh, 1994*). La flora residente en un biofilm estable tiene una función de protección frente a especies exógenas (*McFarland, 2000*) y por ello el tratamiento para combatir la placa va más encaminado a controlarla que a eliminarla por completo (*Marsh, 1994*).

1.1.3.1. Agentes antibacterianos inespecíficos

En base a su actividad antimicrobiana los antisépticos orales se consideran: de muy baja potencia como el timol o el cetilpiridinio, de baja potencia como el fluoruro sódico y de alta potencia como la clorhexidina o la sanguinaria. La sustentividad de un colutorio antiséptico se define como la adherencia prolongada a las superficies orales (dientes y mucosas) y su liberación lenta a dosis eficaces que garanticen la persistencia de la actividad antimicrobiana (*Manau-Navarro y Guasch-Serra, 2005*). Los agentes antisépticos con escasa sustentividad se denominan de primera generación; a este grupo pertenecen los compuestos de

amonio cuaternario, los compuestos fenólicos, los agentes oxidantes y los fluoruros. Los agentes de alta sustantividad como las biguanidas, cuyo principal representante es la clorhexidina se consideran de segunda generación. La incorporación al mercado de nuevos productos como el decapinol, ha obligado a establecer una nueva categoría de colutorios antisépticos los de tercera generación, cuyo mecanismo de acción fundamental es la inhibición de la adherencia bacteriana (Kornman, 1990).

En estudios *in vitro*, la clorhexidina fue la que mostró mayor actividad antibacteriana, seguida de un grupo de antisépticos entre los que se incluyen los aceites esenciales, la octenidina, el fluoruro estañoso y la hexetidina; la eficacia antiséptica del triclosán y los extractos de hierbas resultó muy escasa. En modelos *in vivo*, la clorhexidina y los aceites esenciales son los que mejor penetran la biopelícula y presentan mayor efecto antibacteriano (Serrano y Calsina, 2005).

La clorhexidina es una molécula ambifática con grupos hidrófilos e hidrófobos, que se denomina 1,6-bis-4-clorofenildiguanidohexano (Lang y Brex, 1986). Por tratarse de una base poco hidrosoluble, habitualmente se emplea en forma de sal, fundamentalmente diacetato, diclorhidrato o digluconato (Franch *et al*, 2005). De ellas, la sal de digluconato es la más soluble en agua y alcoholes (Arévalo *et al*, 1998), por lo que es la que se incorpora en la mayor parte de los colutorios, geles y barnices. La noción de “diana” que se utiliza para explicar el mecanismo de acción de los antibióticos también es aplicable a la clorhexidina, aunque a diferencia de éstos no descompone la pared bacteriana (Maris, 1995). A bajas concentraciones, la clorhexidina reduce la permeabilidad de la membrana citoplasmática, alterando su capacidad metabólica, de osmorregulación y su contenido enzimático (Al-Tannir y Goodman, 1994). Esta alteración de la integridad de la membrana constituye su efecto bacteriostático y es de carácter reversible (Franch *et al*, 2005). A concentraciones más elevadas de clorhexidina las interacciones son más severas, provocando la cristalización de la membrana, que finalmente pierde su integridad estructural y permite la salida catastrófica del material celular (Chawner y Gilbert, 1989a; Chawner y Gilbert, 1989b). Esta es la esencia del efecto bactericida de la clorhexidina, que produce la precipitación o coagulación del citoplasma bacteriano, lo que paradójicamente provoca una disminución de la salida de componentes a través de la membrana, que finalmente conduce a la muerte celular.

Después de dos décadas de grandes esfuerzos investigadores y de casi 250.000 publicaciones, todavía no se ha comercializado un producto anti-biofilm definitivo. Se busca un principio activo basado en el efecto anti-adhesión, en la disrupción del *quorum sensing* o en la eliminación selectiva de especies bacterianas (Chen L y Wen YM, 2011).

1.1.3.2. El papel regulador de las adhesinas

La secuencia de crecimiento del biofilm protege a las bacterias adheridas frente a los ataques ambientales; en consecuencia, los componentes activos de un agente antimicrobiano deberían penetrar en la placa para alcanzar a las bacterias adheridas en los estadios iniciales de su formación, ya que son las que unen la placa madura a la superficie del esmalte (*Landa et al, 1997*).

Los patógenos colonizan diferentes lugares del organismo porque expresan múltiples adhesinas; se trata de proteínas que reconocen receptores específicos en diferentes localizaciones. Por ejemplo, para el *Staphylococcus epidermidis*, la adhesión inicial a una superficie está mediada por la adhesina polisacárido (PS/A), cuya expresión está controlada por el operón intercelular de adhesión (Ica) (*Tojo et al, 1988; Zhang et al, 2003*). En cambio, en el *Streptococcus mutans*, la adhesina SpacP (PAC) es de vital importancia para facilitar su adhesión a la superficie del diente, optimizándose el proceso en presencia de sacarosa o cuando existen otros biofilms previos (*Nobbs et al, 2009*).

Aunque el *Streptococcus mutans* se conoce fundamentalmente como una bacteria oral y por ser el agente etiológico primordial de la caries, también se le relaciona con el desarrollo de bacteriemias y de endocarditis infecciosa. Presumiblemente, en la adhesión del *Streptococcus mutans* a diferentes tejidos participarían diferentes adhesinas. En base a la composición química de los polisacáridos de serotipo específico, el *Streptococcus mutans* se clasifica en los serotipos: c, e, f y k. En la cavidad oral, aproximadamente el 70-80% de las cepas son del serotipo c, seguidas por un 20% del serotipo e, mientras que el porcentaje de los serotipos f y k es inferior al 5%. El serotipo k es el que predomina en el *Streptococcus mutans* identificado en muestras de endocarditis, posiblemente como consecuencia de una alteración en la cadena lateral de la glucosa. Estos hallazgos sugieren que el *Streptococcus mutans* puede realizar interacciones de superficie con diferentes tejidos, siendo el serotipo k el que potencialmente tendrá una mayor participación en el desarrollo de infecciones sistémicas (*Nakano et al, 2004*).

1.1.3.3. Inhibidores de las enzimas sortase

En la actualidad, se están estudiando numerosas proteínas de superficie identificadas a partir de diferentes especies microbianas, como adhesinas candidatas para desarrollar agentes anti-adhesión. Las múltiples interacciones adhesina-receptor que expresan diferentes afinidades, representan algunas de las dificultades más importantes que se han encontrado hasta el momento en la caracterización de las adhesinas.

Para minimizar este inconveniente, los investigadores están concentrando sus esfuerzos en las reacciones compartidas por la mayoría de las proteínas de superficie, en lugar de trabajar con adhesinas muy específicas. Las sortases son enzimas de membrana que catalizan los enlaces covalentes de los peptidoglicanos de las proteínas de superficie (Marraffini *et al*, 2006; Mazmanian *et al*, 1999); el análisis del genoma bacteriano indica que la sortase es una enzima común entre las bacterias Gram positivas. En experimentos realizados con *S. aureus* sobre 20 sustratos diferentes, se identificaron sortase en cada cepa secuencial, incluyendo la proteína A (Spa), fibronectinas de unión a proteínas (FnbpA, FnbpB), factores de unión (ClfA, Club), adhesina colágeno (Can), hemoproteínas de unión (IsdC, IsdB, IsdA) y otras proteínas de superficie (Marraffini *et al*, 2006).

Lo mismo ocurre para otros Gram positivos, como *S. epidermidis* y *S. mutans*. La sortase A (srtA) muta sin mostrar todas las proteínas de superficie, mientras que este fenotipo podría ser rescatado por un plásmido que lleva el gen de tipo salvaje. En modelos de estudio animales con sepsis, abscesos, artritis séptica y endocarditis, se demostró que la srtA mutada era menos virulenta que las cepas de tipo salvaje (Jonsson *et al*, 2003; Weiss *et al*, 2004; Gianfaldoni *et al*, 2009). Curiosamente, se han descrito dos cepas clínicas de *S. mutans* que contienen mutaciones en el gen srtA de la sortase: el *S. mutans* Ingbritt contiene una supresión de 11 pares de bases en el srtA ORF que genera una interrupción prematura del codón (Igarashi, 2004), y el *S. mutans* NG5 es portador de una mutación errónea en el gen srtA, que resulta en la formación de enzimas no funcionales (Lee y McGavin, 2004). Ambas cepas segregan PAC y son incapaces de adherirse a la hidroxiapatita y de agregarse en presencia de saliva. En base a estos hallazgos, algunos investigadores han sugerido que la sortase podría constituir una buena diana para impedir la adhesión. Como la sortase es un factor de virulencia universal para los Gram positivos, los inhibidores sortase podrían tener un amplio espectro de aplicaciones clínicas.

Incluso antes de la identificación definitiva de estas adhesinas, se insinuó que algunos compuestos como el metano-tiosulfonato y el ácido p-hidroximercurio-benzoico presente en la naturaleza en las hojas del *Cocullus trilobus* y del *Coptis chinensis* actuaban como inhibidores de las sortase al bloquear el Cys184 de la sortase A, evitando así la adhesión de las bacterias a la fibronectina que recubre la superficie, aunque su aplicación terapéutica está limitada por su toxicidad (Kim *et al*, 2002; Maresso y Scheneewind, 2008). Otros inhibidores de sortase que son objeto de estudio en la actualidad son la diacetona y la cloro-metil-acetona (Maresso y Scheneewind, 2008).

1.1.3.4. Inhibidores del *quorum sensing*

La interrupción de este sistema de comunicación puede mantener a las células en fase planctónica, por lo que los inhibidores del *quorum sensing* pueden constituir potenciales agentes terapéuticos. Desde su descubrimiento en 1960 (Tomasz, 1965), se han identificado y caracterizado varios sistemas principales de *quorum sensing* (Asad y Opal, 2008): el AHL (Gram negativos), el 4-quinolonas (Gram negativos), el péptido AgrD (Gram positivos), el AI2/LuxS (Gram positivos y Gram negativos) y el farnesol (hongos).

Entre un número considerable de inhibidores del *quorum sensing*, destacan por su relevancia los furanones y el péptido inhibidor del ARN III (RIP). Los primeros han sido ampliamente estudiados por su eficacia contra los sistemas AHL y AI2. Además, algunos furanones carentes de efectos inhibitorios de crecimiento, pueden aumentar la susceptibilidad de las biofilms a antibióticos y detergentes (Pan y Ren, 2009). En modelos animales, se ha demostrado que los furanones también podrían actuar como facilitadores del sistema inmunológico para eliminar las infecciones (Wu *et al*, 2004). Después de conjugar AHL con proteínas portadoras, se han generado anticuerpos anti-AHL que podrían tener aplicaciones prometedoras en el control de la enfermedad (Kaufmann *et al*, 2006).

Por último, en experimentos efectuados con *Staphylococcus spp.* (Balaban *et al*, 2003; Balaban *et al*, 2007), se ha demostrado que determinados péptidos inhibidores del ARN III en su forma amida (RIP; YSPWTNF-NH) reducen la virulencia del microorganismo, la formación de biofilm y la resistencia a antibióticos, aunque de momento no puede especularse sobre sus aplicaciones clínicas debido a su escasa estabilidad *in vivo* y por su toxicidad.

1.1.3.5. Péptidos antimicrobianos sintéticos

Los tratamientos con antimicrobianos convencionales de amplio espectro atacan de forma indiscriminada a una subpoblación del biofilm, pudiendo ocasionar nuevos problemas con la eliminación de determinadas especies comensales. Una de las estrategias esgrimidas para llegar a conseguir un biofilm libre de patógenos se fundamenta en la selección de “péptidos antimicrobianos sintéticos dirigidos específicamente” (*siglas en inglés, STAMP*). Se trata de una versión mejorada de tercera generación de los péptidos antimicrobianos (AMPs) que están en la naturaleza y que juegan un papel muy importante en la inmunidad innata

En general, los AMPs son moléculas catiónicas, grandes, con aproximadamente un 50% de terminales hidrófobos, cuyo mecanismo de acción consiste en cargar negativamente las moléculas estructurales de la membrana

microbiana. Estos péptidos tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana y las resistencias son muy poco frecuentes; desafortunadamente, su producción masiva es difícil y muy costosa, y además son sensibles a las proteasas digestivas. Modificando estos péptidos, se han desarrollado los denominados péptidos antimicrobianos sintéticos (*siglas en inglés, SAMPs*), que conservan la eficacia de los primeros pero mejoran sus propiedades farmacocinéticas, aunque su principal inconveniente es que todavía se consideran de amplio espectro. Este problema se solucionó con los *STAMPs*.

Los *STAMPs* representan una nueva opción terapéutica, ya que eliminan patógenos de comunidades multiespecie y/o marcos clínicos específicos (*Eckert et al, 2006*). Un *STAMP* típico contiene un campo obligatorio específico que facilita la unión con un péptido diana; por ejemplo, los péptidos diana específicamente obligatorios del *S. mutans* se derivan de feromonas bacterianas como la CSP (SGS-LSTFFRLFNRSFTQALGK). Recientemente, se ha diseñado un *STAMP* con dos campos de especies-diana, que permite abordar simultáneamente a *Streptococcus mutans* y *Pseudomonas* spp. en un cultivo multiespecie. En un modelo *in vitro* de biofilm dinámico, se demostró que después de la eliminación selectiva de *S. mutans* con un *STAMP*, el biofilm remanente es resistente a la recolonización de nuevos agregados de esta especie (*Li et al, 2010; He et al, 2009*).

Por lo tanto, los *STAMPs* tienen un gran potencial terapéutico, pudiendo eliminar patógenos selectivamente, mientras preservan los beneficios asociados a la flora comensal saludable.

1.2. INFECCIONES PRODUCIDAS POR EL BIOFILM ORAL

1.2.1. Infecciones locales

1.2.1.1. Caries y enfermedad periodontal

La caries y la enfermedad periodontal son las enfermedades más comunes de la boca generadas por el biofilm oral. Ambas son consecuencia de un desequilibrio en las poblaciones bacterianas de los considerados “biofilms naturales”, que normalmente son compatibles con un estado de salud (*Teles et al, 2006*). Factores como la especificidad y la patogenicidad bacterianas, así como la susceptibilidad individual, pueden condicionar el inicio, el patrón de progresión y las características clínicas de las enfermedades orales asociadas al biofilm.

La caries es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por la destrucción de los tejidos del diente como consecuencia de la desmineralización provocada por los ácidos que genera la placa bacteriana. Es indispensable entender el funcionamiento y la complejidad de los biofilms, para poder explicar las dificultades que a menudo hay que afrontar para efectuar un tratamiento clínico adecuado de la caries. La remoción de la estructura dental desmineralizada e infectada, no modifica el proceso de infección primaria de la caries (*Featherstone, 2002; Featherstone, 2003*). Un biofilm saludable puede estar formado por más de 700 especies bacterianas, de las que menos del 1% son bacterias potencialmente cariogénicas; esta biopelícula actúa, paradójicamente, como una primera línea defensiva para ayudar a proteger la cavidad oral de una infección. Un cambio de pH puede favorecer la proliferación de determinadas especies patógenas acidófilas y acidogénicas -como los estreptococos *mutans* y los lactobacilos *spp.*- tomando el control del biofilm y produciendo efectos muy negativos en el tejido dental (*Marsh, 1989; Busscher et al, 1995*).

La enfermedad periodontal comienza por un sobrecrecimiento de ciertas especies bacterianas, prioritariamente Gram negativas y anaerobias, que proliferan en localizaciones subgingivales. La presencia de patógenos orales origina una respuesta inflamatoria persistente y la destrucción de los tejidos de soporte, lo que proporciona la expresión clínica de la enfermedad (*Kornman et al, 1997; Kinane, 2000*).

1.2.1.2. Alveolitis

La alveolitis seca es una complicación postoperatoria de carácter inflamatorio que acontece tras la extracción dental. Cuando el proceso sobrepasa las paredes alveolares, estaríamos ante una osteítis localizada. Fue descrita por primera vez por Crawford en 1896 (*Crawford, 1896*) y desde entonces se han aplicado numerosos términos que se consideran sinónimos de alveolitis seca, entre los que se encuentran: alveolitis seca dolorosa, alveolalgia, osteomielitis u osteítis fibrinolítica, osteítis alveolar, síndrome osteomielítico postextracción, alveolitis fibrinolítica y osteítis alveolar localizada (*Swanson 1989; Swanson, 1990; Moore y Brekke, 1990; Trieger y Schlagel, 1991*). El término más apropiado probablemente corresponde al de alveolitis fibrinolítica (*Birn, 1970*), aunque ha sido utilizado por muy pocos autores.

Se han propuesto hasta 17 definiciones diferentes de la alveolitis, correspondiendo una de las más recientes a Blum (*Blum, 2002*), que define la alveolitis como un *“dolor postoperatorio en y alrededor del alveolo dentario, cuya severidad se incrementa en algún momento entre el primer y el tercer día postextracción, acompañado de una desintegración parcial o total del coágulo sanguíneo intraalveolar, acompañado o no de halitosis”*. Hay que distinguir las alveolitis que ocurren en pacientes que presentan algún tipo de predisposición a la hipovascularización (desórdenes vasculares o hematológicos, osteonecrosis por radioterapia, osteopetrosis, enfermedad de Paget, etc.), de aquellas en las que esta predisposición no se detecta y que en la literatura se denominan “alveolitis verdaderas” (*Blum, 2002; Houston¹ et al, 2002*).

La frecuencia de aparición de la alveolitis ha sido objeto de estudio por muchos autores, que describen resultados muy heterogéneos, desde un 1% hasta un 70% (*Ariza et al, 1999; Blum, 2002*). La mayor incidencia se registra tras la exodoncia de los terceros molares inferiores retenidos, en los que la aparición de esta complicación se estima en un 20-30% de las extracciones (*Blum, 2002*). La prevalencia media de alveolitis en el conjunto de todas las exodoncias es, según distintos autores, del 3-4% (*Jaafar y Nor, 2000*). La variabilidad en la frecuencia de aparición de la alveolitis se debe a diferencias en los criterios diagnósticos, en los métodos de evaluación, en la combinación de registros procedentes de exodoncias sencillas y de dientes retenidos, así como a la variabilidad de la técnica quirúrgica y del tratamiento postquirúrgico.

Puesto que la etiología de la alveolitis no se conoce completamente, la principal estrategia terapéutica de la que se dispone es la prevención. Los estudios epidemiológicos han permitido identificar distintos factores de riesgo en el desarrollo de la alveolitis postexodoncia:

- ✓ *La dificultad de la exodoncia y el trauma quirúrgico.* Muchos autores (*Birn, 1973; Colby, 1997; Brekke et al, 1986; Alexander, 2000*) coinciden en que ésto puede jugar un papel importante en el desarrollo de la alveolitis. Un mayor trauma produciría un retraso en el proceso de curación alveolar, y puede dar lugar a trombosis de los vasos subyacentes y a un detrimento de la resistencia a la infección por parte del hueso alveolar remanente.
- ✓ *La inexperiencia del cirujano.* Muchos estudios confirman que la inexperiencia del cirujano podría relacionarse con un mayor trauma quirúrgico, por lo que ésta condicionaría la aparición de la alveolitis (*Larsen, 1992; Alexander, 2000; Oginni et al, 2003*)
- ✓ *Consumo de anticonceptivos orales.* Los estrógenos y otros fármacos activarían el sistema fibrinolítico de forma indirecta (aumentando los factores II, VII, VIII, X y el plasminógeno), contribuyendo a la lisis prematura del coágulo y al desarrollo de la alveolitis seca (*Sweet y Butler, 1978; Catellani et al, 1980*).
- ✓ *Sexo femenino.* La producción de estrógenos endógenos varía durante el ciclo menstrual, disminuyendo su potencial fibrinolítico en los días 23 a 28 del ciclo. La alveolitis puede llegar a afectar a las mujeres en relación 5:1 con respecto al sexo masculino, presentando una mayor frecuencia entre las que consumen anticonceptivos orales (*Blum, 2002*).
- ✓ *Tabaquismo.* En numerosos estudios se ha demostrado la relación entre el tabaco y la alveolitis (*Sweet y Butler, 1978; Larsen, 1992; Nusair y Younis, 2007*). Blum (*Blum, 2002*) estimó que la tasa de alveolitis aumenta un 20% en los pacientes que fuman mas de un paquete de cigarrillos al día, y hasta un 40% si el paciente fuma el día de la cirugía o en el postoperatorio inmediato. La incorporación de contaminantes a la herida o el efecto de succión sobre el coágulo en formación, son posibles mecanismos por los que el tabaco puede interferir en la cicatrización alveolar.
- ✓ *Factores que disminuyen la irrigación del alveolo.* El empleo de soluciones anestésicas con vasoconstrictor y las técnicas en las que el anestésico se deposita en el entorno del alveolo (como la técnica intraligamentosa), también se han relacionado con la aparición de alveolitis (*Alexander, 2000*). Lehner (*Lehner, 1958*), observó un aumento en la frecuencia de alveolitis en los casos en los que se aplicaba anestesia con vasoconstrictor, argumentando que la isquemia temporal que se producía en el alveolo generaba uncoágulomás pobre, aunque en estudios posteriores se sugirió que este efecto era irrelevante. Otros autores opinan que el aumento en la incidencia de la alveolitis se produce por la diseminación bacteriana a través del ligamento periodontal (*Birn, 1973; Tsirlis et al, 1992*).

- ✓ *La excesiva irrigación del alveolo.* La irrigación exagerada del alveolo podría interferir en la formación del coágulo, así como un curetaje agresivo podría comprometer la formación del hueso alveolar; sin embargo, en la literatura no existe una evidencia científica contundente que avale si estos factores pueden intervenir en el desarrollo de la alveolitis (*Blum, 2002*).
- ✓ *Edad avanzada.* Algunos autores han considerado la longevidad como un factor de riesgo en la aparición de la alveolitis, pero otros no han confirmado esta propuesta (*Larsen, 1992*). Los pacientes con inmunosupresión y los diabéticos, puede tener comprometida la cicatrización y ser más propensos a desarrollar cuadros de alveolitis (*García Murcia y Peñarrocha, 1994*).

Para poder prevenir la aparición de la alveolitis es imprescindible conocer su etiopatogenia; ahí surgen varias incógnitas, en base a las numerosas teorías que se han planteado; sin embargo, hoy en día, la teoría fibrinolítica de Birn (*Birn, 1970*) y la teoría bacteriana, son las que cuentan con una mayor difusión en el ámbito científico:

- ✓ Birn (*Birn, 1970*), propugnó que tras efectuar una exodoncia se pone en marcha una reacción inflamatoria que podría afectar a la formación y la retención del coágulo; la fibrina se desintegraría, bien por el efecto de las quinasas liberadas en el proceso de inflamación o bien por la activación del plasminógeno, comprometiendo la consistencia del coágulo y facilitando la aparición de un alveolo seco (*Larsen, 1991; Larsen 1992; Blum, 2002*). Esta teoría explicaría por qué la incidencia de alveolitis disminuye cuando se efectúan exodoncias múltiples a pesar de que el trauma es mayor, ya que la existencia de un lecho quirúrgico más grande facilitaría el acúmulo de sangre, permitiendo la formación de un coágulo adecuado como primer paso en la secuencia de una cicatrización normal (*Birn, 1970*).

Los factores activadores del plasminógeno pueden ser directos o indirectos (no fisiológicos). También se pueden clasificar en activadores extrínsecos o intrínsecos (presentes en el plasma sanguíneo). Entre los activadores directos intrínsecos se encuentran el dependiente del factor XII y la uroquinasa, ambos mediados por leucocitos. Los activadores del plasminógeno directos extrínsecos incluyen el activador tisular y el endotelial. Los activadores indirectos están constituidos en su mayor parte por sustancias como las estreptoquinasas y las estafiloquinasas. Este último punto permitiría unificar ambas teorías etiopatogénicas, siempre que se reconozca un papel sustancial de estos activadores indirectos en la génesis de la alveolitis mediante un proceso fibrinolítico, acorde con la reducción de la frecuencia de alveolitis observada al ensayar sustancias antimicrobianas (*Blum, 2002*).

- ✓ La segunda teoría, la denominada teoría bacteriana, viene avalada por la existencia de un mayor recuento bacteriano en el área de la exodoncia en los pacientes que desarrollan una osteitis alveolar con respecto a los que no la padecen (*Larsen, 1991*). Se trata primordialmente de gérmenes anaerobios y el dolor se debería al efecto de las toxinas bacterianas sobre las terminaciones nerviosas intraalveolares.

A favor de esta teoría se ha sugerido que la alveolitis seca es más frecuente en pacientes con peor higiene oral (*Peñarrocha et al, 2001*), o cuando existe pericoronaritis previa o enfermedad periodontal concomitante (*Rud, 1970*). Otro argumento que avala la teoría bacteriana es la reducción del número de episodios de alveolitis como consecuencia del uso de agentes antimicrobianos.

Hasta la fecha, no se ha aceptado universalmente una hipótesis etiopatogénica, entre otras razones porque no se dispone de datos concluyentes para aceptar o rechazar ninguna de ellas; incluso podría plantearse que la aparición de una alveolitis respondería a un mecanismo etiopatogénico más complejo, en el que estarían imbricadas ambas teorías.

Esta potencial heterogeneidad en la etiología de la alveolitis, ha propiciado la puesta en marcha de numerosos estudios en los que se ha evaluado la eficacia de diferentes agentes para su prevención, incluyendo antifibrinolíticos, antisépticos o antibióticos (*Torres Lagares et al, 2005; Kolokythas et al, 2010*).

1.2.2. Infecciones focales

1.2.2.1. Endocarditis bacteriana y otras enfermedades cardiovasculares

La relación más conocida entre infecciones orales y enfermedades cardiovasculares, se basa en el papel de las bacteriemias causadas por microorganismos de origen oral en la etiopatogenia de la endocarditis bacteriana. Además, en los últimos años se ha establecido cierta correspondencia entre enfermedad periodontal y alteraciones estructurales de las arterias coronarias, así como con los accidentes vasculares cerebrales (*Persson et al, 2002; Grau et al, 2004; Martos y Márton, 2008*). Se han barajado fundamentalmente 3 mecanismos potenciales para justificar estas asociaciones: la acción directa de los microorganismos sobre la pared vascular, la producción de anticuerpos específicos contra estos agentes patógenos y el papel de los mediadores inflamatorios.

Aunque la etiología infecciosa de la periodontitis está bien establecida (*Socransky y Haffajee, 2005; Paster et al, 2006*), el papel de las bacterias orales

como agentes etiológicos primarios de las enfermedades cardiovasculares es controvertido, y de hecho buena parte de los microorganismos que se han relacionado con las enfermedades cardiovasculares no son comensales habituales de la cavidad oral, como es el caso de *Chlamydia pneumoniae* y *Helicobacter pylori* (Liu et al, 2006; Miyazaki et al, 2006; Nyström-Rosander et al, 2006; Atar et al, 2007). Sin embargo, numerosos autores han demostrado la presencia de bacterias periodontales en muestras recogidas de la aorta y otros vasos sanguíneos, así como en válvulas cardíacas infectadas (Haraszthy et al, 2000; Beck et al, 2005; Fiehn et al, 2005; Kozarov et al, 2006; Nomura et al, 2006; Renvert et al, 2006; Aimetti et al, 2007; Gotsman et al, 2007; Nakano et al, 2006; Nakano et al, 2007; Pucar et al, 2007; Zaremba et al, 2007).

La endocarditis infecciosa se describe como una infección producida por la colonización de las válvulas cardíacas y/o los tejidos circundantes, secundaria a la invasión del torrente circulatorio por parte de agentes patógenos. Puede estar ocasionada por una gran variedad de microorganismos de naturaleza bacteriana, fúngica o vírica (Karchmer, 1991; Baldassarri et al, 2004; Presterl et al, 2005), aunque en términos de prevalencia los más comunes son *Streptococcus viridans* y *Staphylococcus aureus*, paradójicamente comensales habituales de la cavidad oral (Younessi et al, 1998). Concretamente, *Staphylococcus aureus*, es responsable de la mayoría de las endocarditis nosocomiales (Mealey, 1996; Atkinson et al, 1997). Otros microorganismos que también se han implicado son los enterococos y las bacterias del grupo HACEK (*Haemophilus* spp., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella* spp. y *Kingella* spp.) algunos con un reconocido potencial periodontopatógeno, y con menor frecuencia *Capnocytophaga* y *Lactobacillus* spp..

Algunas especies de estreptococos también se han relacionado con el infarto agudo de miocardio (Li et al, 2000; Herzberg et al, 2005; Nomura et al, 2006; Plummer y Douglas, 2006; Renvert et al, 2006). Se ha sugerido que el mismo mecanismo de agregación detectado en el biofilm oral entre *Streptococcus* spp. y *Porphyromonas gingivalis*, podría favorecer la colonización de las células endoteliales (Maeda et al, 2004). En definitiva, el papel de la infección en el infarto coronario, los accidentes vasculares cerebrales y la arterioesclerosis, aún está sujeto a controversia. Steptoe et al (Steptoe et al, 2007) sugirieron que el tamaño del inóculo bacteriano puede ser menos importante en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares de lo que se pensaba, mientras que Renvert et al (Renvert et al, 2010) encontraron una asociación entre el riesgo de infarto agudo de miocardio y la concentración de patógenos periodontales, que aumentaba especialmente cuando existían infecciones orales como la periodontitis crónica (Dajani et al, 1997; Burne, 1998; Slots, 1998). Otros autores, propusieron que en el desarrollo de la arterioesclerosis participa la carga infecciosa total y no sólo una

especie bacteriana en particular (*Espinola-Klein et al, 2002; Honda et al, 2005*), aunque esta propuesta no pudo ser corroborada por otros investigadores que no consiguieron relacionar los recuentos de *Actinobacillus aggragatibacter*, *Porphyromonas gingivalis*, *Parvimonas micra*, *Dialister pneumosintes* ni *Campylobacter rectus*, con la presencia de enfermedad cardiovascular diagnosticada mediante angiografía (*Nonnenmacher et al, 2007*).

El segundo mecanismo etiopatogénico propuesto es la producción de anticuerpos contra los periodontopatógenos más comunes (*Meurman et al, 2003; Mustapha et al, 2007*). Aunque en gran parte de la literatura se subraya el papel de microorganismos que no son habituales de la cavidad oral como *Chlamydia pneumoniae* y *Helicobacter pylori* (*Grabczewska et al, 2006; Kaperonis et al, 2006; Pitiriga et al, 2006; Völzke et al, 2006; Yavuz et al, 2006; Buyukhapitoglu et al, 2007; Hagiwara et al, 2007; Jha et al, 2007; Piechowski-Józwiak et al, 2007; Yoshikawa et al, 2007*), los niveles elevados de anticuerpos contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* se han asociado particularmente con la enfermedad coronaria (*Pussinen et al, 2004a; Pussinen et al, 2004b; Pussinen et al, 2005; Pussinen et al, 2007a; Pussinen et al, 2007b; Beck et al, 2005; Vilkinson-Rautiainen et al, 2006*) y con los accidentes vasculares cerebrales (*Pussinen et al, 2004a; Paju y Scannapieco, 2007*).

El tercer mecanismo que ha cobrado especial relevancia en los últimos años es la presencia de mediadores inflamatorios en el torrente circulatorio. En este sentido, la interleuquina 18 una citoquina proinflamatoria se ha encontrado especialmente elevada en pacientes con periodontitis y con angiografías coronarias patológicas (*Schallhorn et al, 2010*). Feng et al (*Feng et al, 2010*), constataron que el aumento de los niveles del factor de activación plaquetario está asociado a periodontitis y a su vez puede ser un factor de riesgo de enfermedad coronaria. La enfermedad periodontal aumenta la concentración de proteína C reactiva circulante, un reactante de fase aguda que también se asocia al infarto agudo de miocardio, por lo que se ha llegado a sugerir que el tratamiento de la enfermedad periodontal puede constituir un nuevo objetivo para reducir la incidencia de infartos (*Mattila et al, 2002; Pan et al, 2010; Kodovazenitis et al, 2011; Maekawa et al, 2011*). Se ha demostrado que los pacientes con enfermedad coronaria y periodontitis crónica severa pueden tener un perfil lipídico alterado, así como niveles séricos de proteína C reactiva, de interleuquina 6 y de factor de necrosis tumoral alfa, mayores que los que tienen el periodonto sano (*Oliveira et al, 2010; Tang et al, 2011*).

La relación entre periodontitis y enfermedad cardiovascular se ha analizado al menos en dos publicaciones basadas en principios de meta-análisis (*Bahekar et al, 2007; Mustapha et al, 2007*). Bahekar et al (*Bahekar et al, 2007*) seleccionaron 5 estudios prospectivos de cohortes (86.092 pacientes) y

concluyeron que los individuos con enfermedad periodontal tenían un riesgo 1,14 veces mayor de desarrollar enfermedad coronaria que los que no tenían periodontitis; en los estudios de casos y controles (1.423 pacientes) el riesgo aumentó a 2,2 y en los estudios transversales (17.724 pacientes) fue de 1,59. Por su parte, Mustapha et al (*Mustapha et al; 2007*) seleccionaron 12 estudios de cohortes y 7 transversales, y efectuaron un análisis estratificado en base a la presencia de enfermedad coronaria, ictus y engrosamiento de la pared carotídea; su conclusión fue que la enfermedad periodontal se asocia a eventos cardiovasculares y favorece la aterogénesis. En definitiva, las revisiones sistemáticas con meta-análisis coinciden en que la enfermedad periodontal aumenta ligeramente el riesgo de enfermedad cardiovascular (*Meurman et al, 2003; Bahekar et al, 2007; Mustapha et al, 2007*).

Cuando se ajustan los factores demográficos, otros autores han demostrado que no existe una asociación significativa entre periodontitis -determinada en base a la pérdida de inserción clínica- y calcificación de las arterias coronarias (*Nakib et al, 2004*). Sin embargo, se ha descrito una relación significativa entre el estado periodontal -pérdida de inserción y/o profundidad de las bolsas periodontales- y el infarto agudo de miocardio (*Cueto et al, 2005*). Estos hallazgos, aparentemente contradictorios, pueden expresar diferencias en la propia evaluación del estado periodontal. La mayoría de los estudios en los que la periodontitis constituye un factor de riesgo relevante para las enfermedades cardiovasculares, suelen evaluar el estado periodontal en base a la pérdida ósea alveolar, en lugar de recurrir a la pérdida de inserción y/o la profundidad de sondaje (*Persson et al, 2003; Engebretson et al, 2005; Geismar et al, 2006; Rech et al, 2007*). Beck et al (*Beck et al 2005*), confirmaron que los signos clínicos (sangrado al sondaje, profundidad de sondaje, nivel de inserción) no son representativos del impacto de los efectos acumulativos de la periodontitis en la salud sistémica. Además, se han descrito otras variables que pueden condicionar las tasas de prevalencia de periodontitis y en consecuencia los resultados de estos estudios, como la edad, la etnia o la ubicación demográfica.

1.2.2.2. Infecciones respiratorias

En el año 2004, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica representó la cuarta causa de muerte en EE.UU., al alcanzar una tasa de 43,3 decesos por cada 100.000 habitantes (*National Center for Health Statistics, 2005*). Ese mismo año, la incidencia de las neumonías adquiridas en la comunidad fue de 11,6 casos/1.000 adultos (*Marrie y Huang, 2005*). Anualmente se registran en EE.UU. 500.000 hospitalizaciones relacionadas con la neumonía (*Centers for Disease Control and Prevention, 2005*), que conllevan unos costes de atención

ambulatoria y de hospitalización de aproximadamente 385 millones y 8,4 billones de dólares, respectivamente (Amin *et al*, 2004).

La neumonía es el segundo tipo más común de infección nosocomial (Loesche y Lopatin, 1998; Centers for Disease Control and Prevention, 2005) y representa el 15% de todas las infecciones adquiridas en medio hospitalario (Centers for Disease Control and Prevention, 2005). La incidencia de neumonía nosocomial se ha estimado en 25-44 casos por cada 10.000 personas mayores de 60 años, con tasas de mortalidad del 21-70% en las unidades de cuidados intensivos (Loesche y Lopatin, 1998). Los principales agentes causales de las neumonías adquiridas en la comunidad son *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* (Marik, 2001), mientras que en el medio hospitalario los microorganismos más frecuentes son *Staphylococcus aureus* y *Enterobacter spp.* (Amin *et al*, 2004).

Scannapieco (Scannapieco, 1999), describió 4 posibles mecanismos para explicar el papel potencial de las bacterias orales en la patogénesis de las infecciones respiratorias, particularmente de las adquiridas en el entorno hospitalario:

- Los microorganismos que colonizan la placa dental pueden ser patógenos pulmonares.

Se ha sugerido que la cavidad oral puede ser un reservorio para los patógenos respiratorios responsables de la neumonía por aspiración en pacientes de alto riesgo (Scannapieco *et al*, 1992; Fourrier *et al*, 1998; Russell *et al*, 1999; Didilescu *et al*, 2005). Algunos investigadores, después de analizar el aspirado pulmonar de pacientes con neumonía por aspiración, han proporcionado nuevas pruebas de la participación de los microorganismos periodontales (Bartlett y Finegold, 1974). A partir de colecciones purulentas procedentes de abscesos pulmonares, se han aislado una gran variedad de anaerobios orales y bacterias facultativas, entre las que se identificaron: *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides gracilis*, *Bacteroides oralis*, *Bacteroides buccae*, *Eikenella corrodens*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium necrophorum*, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium spp.* y *Actinomyces spp.* (Goldstein *et al*, 1979; Suwanagool *et al*, 1983; Joshi *et al*, 1991; Zijlstra *et al*, 1992; Mahomed *et al*, 1992; Brook y Frazier, 1993; Lorenz y Weiss, 1994; Morris y Sewell, 1994; Yuan *et al*, 1994; Chen *et al*, 1995).

- Las enzimas salivales favorecen la colonización del tracto respiratorio.

Algunas enzimas presentes en la saliva como la proteasa, pueden modificar la superficie de las mucosas promoviendo la adhesión y la colonización de los patógenos respiratorios (Johanson *et al*, 1972; Johanson *et al* 1980; Woods

et al, 1981). El origen de estas enzimas se ha atribuido a las bacterias (*Nakamura y Slots*, 1983; *Zambon et al*, 1985; *Loesche et al*, 1987; *Wikstrom y Linde*, 1986; *Frandsen et al*, 1987) o a los leucocitos polimorfonucleares que alcanzan la saliva a través del surco gingival (*Cimasoni et al*, 1977). En la placa bacteriana de algunos pacientes con enfermedad periodontal son especialmente abundantes determinadas bacterias que producen grandes cantidades de proteasas, como *Porphyromonas gingivalis* y espiroquetas.

- Efecto enzimático hidrolítico.

Las enzimas hidrolíticas, cuya concentración aumenta en los individuos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, pueden modificar la mucina, y la capacidad de adhesión y aclaramiento de los patógenos (*Davies et al*, 1995; *Barsum et al*, 1995; *Reddy et al*, 1997). Algunas enzimas asociadas a la enfermedad periodontal pueden destruir la película salival que recubre las bacterias patógenas, alterando la adhesión de determinadas bacterias como *Haemophilus influenzae* a las secreciones mucosas.

- Acción de citoquinas proinflamatorias de origen periodontal.

Se ha sugerido que la liberación de citoquinas proinflamatorias (como la interleuquina 8) podría explicar los daños detectados en el epitelio respiratorio de los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, provocando una infiltración de neutrófilos, y la subsecuente liberación de enzimas proteolíticas y de radicales libres de oxígeno (*Durum y Oppenheim*, 1993; *Khair et al*, 1996). Los mecanismos de liberación de estas citoquinas a partir del epitelio respiratorio pueden ser consecuencia directa de la adhesión de patógenos respiratorios -como *Haemophilus influenzae*- (*Hakansson et al*, 1996) o de los productos secretados por las células epiteliales. En la enfermedad periodontal no tratada, los patógenos orales estimulan continuamente las células del periodonto (células epiteliales, endoteliales, fibroblastos, macrófagos y leucocitos), que liberan una gran variedad de citoquinas como interleuquinas-1 α , -1 β , -6, y -8, factor de necrosis tumoral alfa y otras moléculas biológicamente activas (*Reddi et al*, 1996; *Wilson et al*, 1996). Se ha especulado que éstas citoquinas originales de los tejidos periodontales podrían alterar el epitelio respiratorio y promover la infección por patógenos respiratorios.

La existencia de una posible asociación entre salud oral y neumonía ha sido objeto de numerosas publicaciones (*Mojon et al*, 1997; *Fourrier et al*, 1998; *Langmore et al*, 1998; *Terpenning et al*, 2001; *El-Solh et al*, 2004). Langmore et al (*Langmore et al*, 1998), efectuaron un seguimiento a 189 personas de edad avanzada durante un período de 4 años, y concluyeron que la existencia de caries activas y el grado de dependencia para las prácticas de higiene oral, se asociaban con una mayor prevalencia de neumonías. Terpenning et al (*Terpenning et al*,

2001), en un estudio de características similares, evaluaron a 358 ancianos durante 9 años y comprobaron que la presencia de caries, la flora cariogénica y los patógenos periodontales, representaban factores de riesgo significativos de neumonía por aspiración. En general, la mayoría de los autores coinciden en que la carga bacteriana cariogénica y periodontopatógena, representan factores de riesgo potenciales para el desarrollo de neumonías (*Mojon et al, 1997; Langmore et al, 1998; Terpenning et al, 2001*). En estudios realizados en pacientes hospitalizados, se ha sugerido incluso que la placa dental puede actuar como un reservorio de patógenos bacterianos respiratorios (*El Attar et al, 2010; Zuannazi et al, 2010*).

La relación entre salud oral y enfermedad pulmonar obstructiva crónica ha sido objeto de numerosos estudios transversales, en el marco de las *National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES I y III)*. Aunque algunos autores sostienen que esta relación es poco consistente (*Hayes et al, 1998; Scannapieco et al, 1998; Scannapieco y Ho, 2001*), otras publicaciones más recientes han revelado que una salud periodontal pobre, con edentulismo e índices de placa elevados, empeora la calidad de vida de los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (*Zou et al, 2011*). En este sentido, se ha demostrado que la periodontitis crónica -especialmente la pérdida de inserción periodontal severa- es común en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, y que el compromiso respiratorio se agrava con un nivel de higiene oral deficiente y cuando aumenta el número de localizaciones con sangrado gingival (*Leuckfeld et al, 2008; Deo et al, 2009*).

Se han publicado varios ensayos clínicos en los que se practicaron intervenciones dirigidas a mejorar la salud oral para analizar su repercusión en la aparición y/o la progresión de neumonías; los métodos utilizados en estos estudios incluyeron: tratamiento odontológico profesional, enjuagues con clorhexidina al 0,12%, aplicaciones tópicas de clorhexidina en gel al 0,2% y aplicaciones tópicas de soluciones antibióticas; en general, la implementación de estas medidas disminuyó la carga bacteriana oral y la prevalencia de neumonías nosocomiales, particularmente en pacientes sometidos a ventilación mecánica (*Yoneyama et al, 1996; Fourrier et al, 2000; Bergmans et al, 2001; Genuit et al, 2001*).

Existen al menos 2 revisiones sistemáticas en las que se analizó la posible asociación entre enfermedades respiratorias y salud oral (*Scannapieco et al, 2003; Amir y James, 2006*). Scannapieco et al (*Scannapieco et al 2003*) seleccionaron 11 estudios de casos-controles y de cohortes (1.413 pacientes) y 9 ensayos clínicos aleatorizados (1.759 pacientes); aunque sólo pudieron incluir 5 para efectuar un meta-análisis y los resultados no fueron del todo concluyentes, los autores señalaron que existe una asociación entre enfermedad periodontal y neumonía, y una posible asociación entre enfermedad periodontal y enfermedad pulmonar

obstructiva crónica; además, advirtieron que la incidencia de neumonía nosocomial se reducía en un 40% cuando se aplicaban medidas de desinfección química o mecánica de la cavidad oral, así como con la administración de antibióticos. Amir y James (*Amir y James, 2006*) identificaron 9 trabajos de casos-contróles y de cohortes, en los que se examinaba la relación entre neumonía y enfermedad pulmonar obstructiva crónica con el estado de salud oral; también encontraron 9 ensayos clínicos en los que se comprobó cómo la mejora de los indicadores de salud oral conllevaba una reducción de la incidencia de neumonías.



1.3. PROFILAXIS ANTIMICROBIANA DE LAS INFECCIONES PRODUCIDAS POR EL BIOFILM ORAL

1.3.1. Profilaxis de las infecciones locales

1.3.1.1. Profilaxis de la alveolitis con clorhexidina

Debido a la compleja etiopatogénesis de la alveolitis, se han estudiado numerosas modalidades terapéuticas para desestructurar el biofilm oral, resultando de especial interés la clorhexidina (CHX), por su contrastado potencial antimicrobiano. La CHX es un antiséptico de amplio espectro, eficaz contra patógenos aerobios y anaerobios, con un escaso índice de resistencias y pocos efectos secundarios. No existe un criterio unánime con respecto a la concentración, la posología o la forma galénica de presentación de la CHX, cuando se utiliza como antiséptico para la prevención de la alveolitis (*Caso et al, 2005; Hedström y Sjögren, 2007; Minguez-Serra et al, 2009*).

En la década de los 70 se publicaron los primeros estudios sobre la aplicación de la CHX para prevenir la aparición de la alveolitis postexodoncia. En 1971, Macgregor (*MacGregor y Hart, 1971*) afirmó que un enjuague preoperatorio con CHX al 0,2% no era efectivo como antiséptico en los procedimientos de cirugía oral. Legarth (*Legarth, 1977*) estudió el efecto de la CHX al 0,2% en 60 pacientes y, en contraste con estos resultados, observó una reducción de la frecuencia de alveolitis del 45%. Tjernberg (*Tjernberg, 1979*) encontró un solo caso de alveolitis en un grupo experimental de 30 pacientes que se enjuagaron con CHX al 0,2%, frente a 5 casos en 30 pacientes del grupo control. En un estudio publicado en 1986 por Krekmanov y Nordenram, (*Krekmanov y Nordenram, 1986*), se detectó una disminución del 11 % en la prevalencia de alveolitis entre los pacientes que realizaban enjuagues con CHX al 0,2%, con respecto a los que no empleaban el antiséptico.

El primer estudio clínico aleatorizado y controlado que demostró la eficacia de la CHX al 0,2% en la prevención de la alveolitis fue publicado por Field en 1988 (*Field et al, 1988*). Los participantes fueron distribuidos en tres grupos: el primero no recibió ningún tipo de irrigación, en el segundo se realizó una irrigación preoperatoria del surco gingival con solución salina y el tercer grupo recibió una irrigación también preoperatoria del área crítica peridontaria con CHX al 0,2%. Los resultados demostraron una tendencia hacia la disminución

de casos de alveolitis en el grupo tratado con CHX, aunque las diferencias entre los resultados obtenidos en los tres grupos no alcanzaron significación estadística.

En 1990, Berwick y Lessin (*Berwick y Lessin, 1990*) fueron los primeros que utilizaron la CHX con fines profilácticos al 0,12%. Estos autores realizaron un estudio en 80 pacientes a los que se les iban a exodonciar los terceros molares y los distribuyeron en 4 grupos: al primero le administraron un enjuague preoperatorio de CHX al 0,12% durante un minuto, irrigando el alveolo después de la exodoncia con 15 ml de CHX diluida en 15ml de suero salino; al segundo grupo se le aplicó el mismo protocolo pero cambiando la CHX por cetilpiridinio; el tercer grupo recibió un protocolo similar al primero, salvo que la irrigación postexodoncia se realizó solamente con suero salino; por último, al cuarto grupo no se le realizó ningún tipo de enjuague preoperatorio. En base a los resultados de este estudio, los autores concluyeron que ni la CHX ni el cetilpiridinio eran más eficaces que la irrigación postexodoncia con suero salino en términos de prevención de la alveolitis.

En 1991, Ragno et al (*Ragno y Szkutnik, 1991*) publicaron un estudio a doble ciego en el que se incluyeron 80 pacientes con 160 terceros molares programados para exodoncia. Los 40 pacientes del grupo experimental realizaron un enjuague preoperatorio con 15ml de CHX al 0,12% durante 30 segundos; una vez realizada la exodoncia se les irrigó el alveolo con la misma solución; a partir del día siguiente la aplicaron en colutorio, enjuagándose dos veces al día durante 7 días. El grupo control realizó el mismo protocolo pero con una sustancia placebo. Este estudio fue el primero en el que se evaluó la eficacia de la CHX como tratamiento postoperatorio para la prevención de la alveolitis, confirmándose que esta práctica reducía el riesgo de su aparición después de una exodoncia del tercer molar.

Ese mismo año, Larsen (*Larsen, 1991*) publicó un estudio en un grupo de 139 pacientes a los que distribuyó en dos subgrupos: los del primero, recibieron enjuagues con CHX al 0,12% dos veces al día durante la semana anterior y la posterior a la exodoncia, mientras que el otro subgrupo siguió el mismo régimen de tratamiento pero con una solución placebo. Justo antes de la exodoncia todos los participantes realizaban un enjuague con CHX o placebo, y al finalizar el procedimiento quirúrgico se irrigaba el alveolo con 40ml de agua estéril. La prevalencia de alveolitis fue de 8,3% en el subgrupo de CHX *versus* 20,9% en el de placebo. Estos resultados demostraron que la CHX aplicada durante una semana antes y después de una exodoncia, reducía la frecuencia de alveolitis postexodoncia.

En 1992, Fotos et al (*Fotos et al, 1992*) publicaron un estudio controlado a doble ciego, en el que se incluyeron 70 pacientes programados para exodoncias bilaterales de los terceros molares. En este trabajo, se evaluó el grado de

disconfort de los pacientes y no la aparición de alveolitis. El alveolo de la primera exodoncia se irrigó con una solución salina, mientras que en el contralateral se aplicó una solución de CHX al 0,1% o al 0,2% diluida en agua estéril (esta solución se impregnaba en una esponja de gelatina y se colocaba dentro del alveolo). Se evaluó a los pacientes al sexto día del postoperatorio, y se comprobó que la solución de CHX al 0,2% reducía significativamente las complicaciones y el grado de disconfort, mientras que los resultados con CHX al 0,1% no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

Bonine (*Bonine, 1995*), realizó un estudio en 371 pacientes con 654 terceros molares incluidos. En un primer grupo, los pacientes no recibieron ningún tratamiento pre- o postoperatorio de higiene oral; en el segundo, después de la cirugía realizaron enjuagues de CHX al 0,12% cada 12 horas durante 14 días; finalmente, en el tercero, los pacientes realizaron un único enjuague prequirúrgico con CHX al 0,12%. Los resultados demostraron una reducción significativa en la frecuencia de alveolitis en los pacientes que efectuaron enjuagues con CHX durante dos semanas, mientras que un único enjuague antes de la exodoncia resultó ineficaz.

En 1998, Hermesch et al (*Hermesch et al, 1998*) publicaron un estudio controlado a doble ciego, que incluyó 279 pacientes a los que se iba a efectuar la exodoncia de al menos un molar. Los pacientes recibieron CHX al 0,12% o una sustancia placebo dos veces al día durante la semana previa y la posterior a la cirugía. Los resultados confirmaron la eficacia de la CHX al 0,12% en la prevención de la alveolitis después de una exodoncia. La prevalencia de alveolitis fue del 29,6% en el grupo placebo *versus* 18,4% en el grupo de la CHX, lo que supuso una reducción del 38% en la frecuencia de alveolitis.

Delibasi et al (*Delibasi et al, 2002*) evaluaron la eficacia de la CHX al 0,2% sola y en combinación con un antibiótico. Para ello, diseñaron un estudio con 177 pacientes a los que distribuyeron en tres grupos: el grupo 1 realizó un enjuague de CHX al 0,2% antes de la cirugía, una vez realizada la exodoncia se irrigó el alveolo con una solución de CHX diluida en suero salino y en el período postquirúrgico los pacientes se enjuagaron con CHX dos veces al día durante 7 días; el grupo 2 realizó el mismo protocolo que el grupo 1, pero además, después de la cirugía se les prescribió Amoxicilina/Ácido Clavulánico a dosis de 500/125mg dos veces al día durante 5 días; el tratamiento del grupo 3 fue similar al del grupo 1, pero se sustituyó la CHX por una solución de suero salino (ClNa 0,09%). Los autores de este trabajo no encontraron diferencias en la aparición de alveolitis entre los grupos 1 y 3, pero sí la hubo con respecto al grupo 2. Su conclusión fue que la CHX sola no disminuye la frecuencia de alveolitis postexodoncia, mientras que sí es eficaz cuando se combina con un antibiótico B-lactámico.

En 2006, Metin et al (*Metin et al, 2006*) llevaron a cabo un estudio clínico randomizado con 99 pacientes tratados con enjuagues de CHX al 0,2%. Un grupo se enjuagó dos veces al día desde una semana antes y hasta una semana después de efectuar la exodoncia, mientras que el otro grupo solamente se enjuagó la semana posterior al procedimiento quirúrgico. Los pacientes fueron evaluados a los 7 días y los resultados no mostraron diferencias en la prevalencia de alveolitis en base al régimen aplicado.

Torres-Lagares et al (*Torres-Lagares et al, 2006*), publicaron un estudio randomizado y a doble ciego, en el que evaluaron la eficacia de un gel bioadhesivo de CHX al 0,2%. Después de completar la exodoncia, al grupo experimental constituido por 53 pacientes se le colocó el gel de CHX en el interior del alveólo, mientras que al grupo control 50 pacientes se le aplicó un placebo de características similares. Los resultados revelaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de aparición de alveolitis, disminuyendo desde el 30% en el grupo control al 11% en el grupo que recibió la CHX. Los autores concluyeron que el gel bioadhesivo de CHX es una buena alternativa para la prevención de la alveolitis.

En esta misma línea sobre la eficacia de la CHX en gel, Hita-Iglesias et al (*Hita-Iglesias et al, 2008*), compararon un gel de CHX al 0,2% con enjuagues de CHX al 0,12%. El estudio incluyó 41 pacientes a los que se aplicó el gel y 32 que recibieron el enjuague. Los resultados demostraron una reducción estadísticamente significativa en la prevalencia de alveolitis en el grupo tratado con el gel de CHX.

En 2009, Smith (*Smith, 2009*) publicó un estudio con un diseño muy parecido, donde también comparó el gel de CHX al 0,2% con los enjuagues de CHX al 0,12%. En el grupo experimental conformado por 41 pacientes se aplicó el gel en el alveolo durante una semana después de la cirugía, mientras que en el grupo control 32 pacientes se realizaron enjuagues de CHX al 0,12%. La conclusión del trabajo fue que en el grupo que utilizó el gel de CHX, había un 70% menos de alveolitis.

En 2010, Torres-Lagares et al (*Torres-Lagares et al, 2010*) realizaron un estudio con las mismas características que el que habían publicado 4 años antes, pero en pacientes con discrasias sanguíneas. Las conclusiones de ambos trabajos coincidieron, ya que se demostró que en los pacientes con estas alteraciones una única aplicación intraalveolar de gel de CHX al 0,2% tras la exodoncia de un tercer molar, también reducía la aparición de alveolitis.

Sridhar et al (*Sridhar et al, 2011*) desarrollaron una investigación clínica en la que evaluaron la eficacia de los enjuagues de CHX para prevenir la alveolitis después de exodonciar un tercer molar. El estudio consistió en efectuar

exodoncias bilaterales a 50 pacientes; en la primera no se aplicaba ningún tipo de profilaxis, pero para realizar la exodoncia contralateral el paciente se enjuagaba dos veces al día durante 8 días con CHX al 0,2% (desde el día previo a la cirugía hasta 7 días después). La prevalencia de alveolitis fue del 8% cuando los pacientes no aplicaron la CHX y por el contrario no se registró ningún caso tras aplicar el protocolo antiséptico.

Babar et al (*Babar et al, 2012*), también publicaron un estudio para determinar la eficacia de la CHX en forma de gel colocada en el alvéolo después de completar la exodoncia para prevenir la alveolitis. Se intervino a 100 pacientes; a 50 se les aplicó una dosis de gel y los otros 50 constituyeron el grupo control. Entre los primeros se detectaron 4 casos de alveolitis (8%) frente a 14 casos (28%) entre los controles

Rodríguez-Pérez et al (*Rodríguez-Pérez et al, 2013*) compararon la eficacia del gel de CHX intraalveolar al 0,2% *versus* 1%. A los 88 pacientes que conformaron el grupo de estudio se les colocó un gel de CHX al 0,2% en el alvéolo después de la exodoncia, pero después se distribuyeron en dos subgrupos en los que, dos veces al día y durante 7 días, unos pacientes aplicaban el gel al 0,2% y otros al 1%. El resultado fue que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos protocolos.

Recientemente, Haraji et al (*Haraji et al, 2013*) publicaron un estudio donde demostraron la reducción de la frecuencia de alveolitis tras la aplicación intraalveolar de una esponja de gelatina empapada en un gel de CHX al 0,2%. A 80 pacientes se les exodonciaron dos terceros molares; en un alvéolo se aplicó CHX y en el contralateral un placebo. Se constató una diferencia significativa en la prevalencia de alveolitis que fue del 11,3% y del 32,6%, respectivamente.

La aplicación de CHX para prevenir la alveolitis es un tema de especial auge en la actualidad, como demuestra el hecho de que en los tres últimos años se hayan publicado hasta 5 revisiones bibliográficas sobre el tema (*Bowe et al, 2011; Yengopal y Mickenautsch, 2012; Richards, 2012; Daly et al, 2012; Dodson, 2013*), frente a sólo dos en las tres décadas previas (*Caso et al, 2005; Hedstrom y Sjogren, 2007*).

Los resultados de los trabajos más relevantes publicados hasta la fecha de la profilaxis de la alveolitis con CHX se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Profilaxis de la alveolitis con clorhexidina (CHX)

Autor (año)	Pacientes	Intervención	Resultados casos/total	Conclusiones
Tjernberg (1979)	G1= 30 G2= 30	Enjuague CHX 0,12%/12h (5 días antes a 8 después) Sin profilaxis	1/30 5/30	CHX puede disminuir la prevalencia de alveolitis pero la diferencia no es significativa
Krekmanov y Nordenram (1986)	G1= 37 G2= 37 G3= 36	Penicilina V/6h (1h antes de la cirugía hasta 3 días) + enjuague prequirúrgico CHX 0,2% + irrigación alveolar CHX 0,2% Sólo CHX Sin profilaxis	2/37 3/37 7/36	Hay diferencias significativas en el nº de alveolitis; mejor combinar CHX y penicilina V
Field (1988)	G1= 108 G2= 108 G3= 108	Irrigación surco gingival CHX 0,2% + enjuague prequirúrgico Irrigación + enjuague suero salino Sin profilaxis	4/108 12/108 10/108	CHX reduce significativamente la prevalencia de alveolitis
Berwick y Lessin (1990)	G1= 39 G2= 40 G3= 40 G4= 38	Enjuague prequirúrgico CHX 0,12% + irrigación alveolar CHX Enjuague + irrigación cetilperidino 0,05% Enjuague CHX + irrigación suero Irrigación suero	7/39 9/40 9/40 9/38	No hay diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de alveolitis
Ragno (1991)	G1= 80 G2= 80	Enjuague prequirúrgico CHX 0,12% + irrigación alveolar CHX + enjuagues 7 días postexodoncia Igual pero con placebo	14/80 20/80	Reducción significativa en la frecuencia de alveolitis (p= 0,008)
Larsen (1991)	G1= 144 G2= 134	Enjuague CHX 0,12%/12h (1 semana antes y otra después) + enjuague prequirúrgico CHX Igual pero con placebo	12/144 28/134	Reducción significativa en la frecuencia de alveolitis (p= 0,01)
Fotos (1992)	G1= 27 G2= 43	Solución salina o CHX 0,1% Solución salina o CHX 0,2%	Se evalúa el disconfort	Reducción significativa del disconfort con CHX 0,2% (p= 0,002)
Bonine (1995)	G1= 271 G2= 304 G3= 79	Enjuague CHX 0,12%/12h (1 semana antes y otra después) Enjuague prequirúrgico CHX Sin profilaxis	18/271 50/304 13/79	Reducción significativa en la frecuencia de alveolitis en el grupo 1 con respecto al 2 y al 3 (p< 0,001)
Hermesch (1998)	G1= 239 G2= 240	Enjuague CHX 0,12%/12h (1 semana antes y otra después) Igual pero con un placebo	31/239 56/240	Reducción estadísticamente significativa de la frecuencia de alveolitis (p= 0,014)
Ragno (1991)	G1= 80 G2= 80	Enjuague prequirúrgico CHX 0,12% + irrigación alveolar CHX + enjuagues 7 días postexodoncia Igual pero con placebo	14/80 20/80	Reducción significativa en la frecuencia de alveolitis (p= 0,008)
Larsen (1991)	G1= 144 G2= 134	Enjuague CHX 0,12%/12h (1 semana antes y otra después) + enjuague prequirúrgico CHX Igual pero con placebo	12/144 28/134	Reducción significativa en la frecuencia de alveolitis (p= 0,01)
Fotos (1992)	G1= 27 G2= 43	Solución salina o CHX 0,1% Solución salina o CHX 0,2%	Se evalúa el disconfort	Reducción significativa del disconfort con CHX 0,2% (p= 0,002)
Bonine (1995)	G1= 271 G2= 304 G3= 79	Enjuague CHX 0,12%/12h (1 semana antes y otra después) Enjuague prequirúrgico CHX Sin profilaxis	18/271 50/304 13/79	Reducción significativa en la frecuencia de alveolitis en el grupo 1 con respecto al 2 y al 3 (p< 0,001)
Hermesch (1998)	G1= 239 G2= 240	Enjuague CHX 0,12%/12h (1 semana antes y otra después) Igual pero con un placebo	31/239 56/240	Reducción significativa de la frecuencia de alveolitis (p= 0,014)

1. INTRODUCCIÓN

Autor (año)	Pacientes	Intervención	Resultados casos/total	Conclusiones
Delibasi (2002)	G1= 62	Enjuague prequirúrgico CHX 0,2% + CHX diluida intraoperatoria + enjuague/12h (7 días después)	13/62	Reducción estadísticamente significativa de las alveolitis con el régimen de antibiótico (p= 0,001)
	G2= 56	Igual protocolo + AMX/CLV 500/125mg (5 días después de la cirugía)	6/56	
	G3= 59	Igual protocolo que el grupo 1 pero con solución salina (ClNa 0,09%)	14/59	
Metin (2006)	G1= 46	Enjuague CHX 0,2%/12h (7 días antes y 7 después de la cirugía)	3/46	No hay diferencias estadísticamente significativas entre los dos protocolos
	G2= 53	Igual protocolo pero solo 7 días después	6/53	
Torres-Lagares (2006)	G1= 53	Gel CHX 0,2% en el alveolo tras la exodoncia	3/46	Reducción estadísticamente significativa con el gel de CHX (p= 0,019)
	G2= 50	Gel placebo	6/46	
Hita-Iglesias (2008)	G1= 41	Gel CHX 0,2%/12h en el alveolo (7 días después de la cirugía)	3/40	Diferencias estadísticamente significativas entre las dos posologías (p= 0,04)
	G2= 32	Enjuague CHX 0,12%/12h (7 días)	8/32	
Sridhar (2011)	G1= 50	Enjuague CHX 0,2%/12h (1 día antes y 7 después de la exodoncia)	0/50	Reducción estadísticamente significativa con la CHX
	G2= 50	Sin profilaxis	4/50	
Babar (2012)	G1= 50	Gel CHX en el alveolo el día de la exodoncia	4/50	Reducción estadísticamente significativa (p= 0,017)
	G2= 50	Gel placebo	14/50	
Rodríguez-Perez (2013)	G1= 42	Gel CHX 1% en el alveolo cada 12h (7 días después de la cirugía)	3/42	No hay diferencias estadísticamente significativas
	G2= 46	Igual pero con gel de CHX 0,2%	6/46	
Haraji (2013)	G1= 80	Gel CHX 0,2% en el alveolo	NE	Reducción estadísticamente significativa (p= 0,001)
	G2= 80	Gel placebo		

G= Grupo de tratamiento; AMX/CLV= Amoxicilina/Ácido Clavulánico; NE= no especificado

1.3.1.2. Profilaxis de la alveolitis con antibióticos

Antibióticos por vía tópica

Se ha publicado un número importante de estudios en relación a la efectividad de los antibióticos administrados por vía tópica en la prevención de la alveolitis. Los principios activos estudiados se han aplicado solos o en combinación, con diferentes dosis y formulaciones. De todos los antibióticos evaluados, la tetraciclina fue la que proporcionó mejores resultados (Swanson, 1989; Davies et al, 1981; Sorensen y Preisch, 1987; Akota et al, 1998).

La forma de presentación ha sido heterogénea, incluyendo polvos, suspensión acuosa y esponjas embebidas en gel. Sin embargo, ha habido algunos detractores de ésta práctica, por la aparición de diferentes efectos secundarios. Por ejemplo, el caso de un paciente que desarrolló una disestesia 6 meses después de que le exodonciaran un tercer molar mandibular, como consecuencia de la aplicación intraalveolar de tetraciclina (Zuniga y Leist, 1995).

En 2004, Sanchís et al (Sanchís et al, 2004) realizaron un trabajo en el que la aplicación de tetraciclina intraalveolar no redujo la frecuencia de alveolitis, aunque disminuyó el dolor y el consumo de analgésicos; sin embargo, este efecto no alcanzó significación estadística. Paradójicamente, en un estudio más reciente realizado en ratas, se demostró que la aplicación tópica de tetraciclina reducía la aparición de alveolitis, produciendo cambios en la microflora del área quirúrgica y disminuyendo el número de bacterias anaerobias (Bosco et al, 2008).

Antibióticos por vía sistémica

Aunque se ha sugerido que algunos antibióticos administrados por vía sistémica como la penicilina (Laird et al, 1972; Krekmanov y Nordenram, 1986), la clindamicina (Laird et al, 1972; Bystedt et al, 1980), la eritromicina (Bystedt et al, 1980) o el metronidazol (Rood y Murgatroyd, 1979; Barclay, 1987) pueden ser eficaces en la prevención de la alveolitis, su prescripción de forma rutinaria antes o después de la intervención está muy cuestionada, por el desarrollo de resistencias bacterianas, por la aparición de reacciones de hipersensibilidad y por la eliminación innecesaria de multitud de bacterias comensales (Blum, 2002; Ataoglu et al, 2008).

La profilaxis antibiótica en la cirugía del tercer molar para la prevención de una infección local ha sido motivo de controversia durante años. Ya en la década de los 60, se esgrimieron argumentos muy convincentes sobre la necesidad de tomar un antibiótico para prevenir la alveolitis; se demostró que con una única dosis de penicilina previa a la cirugía, la prevalencia de alveolitis se reducía del

24% al 3%, aumentando aún más su efectividad cuando el paciente había tenido algún episodio previo de pericoronaritis (Kay, 1966).

Por el contrario, muchos autores cuestionaron la eficacia de esta práctica. Por ejemplo, en 1974, Curran et al (Curran et al, 1974) demostraron en un grupo de estudio de 68 pacientes, que la penicilina G (1 millón UI im/24 horas) administrada desde 4 días antes hasta 4 después de la cirugía no reducía la aparición de alveolitis postexodoncia.

Barclay et al (Barclay, 1987), compararon la eficacia de la administración de metronidazol antes y después de la cirugía con un placebo. A los pacientes del grupo experimental les administraron 400 mg de metronidazol una hora antes de la cirugía y posteriormente cada 8 horas durante los tres días posteriores a la exodoncia. La prevalencia de alveolitis en el grupo de estudio y en el grupo placebo fue de 34% y 17,8%, respectivamente. Sin embargo, estos resultados son discutibles, ya que los pacientes se consideraban de riesgo alto por haber tenido pericoronaritis previas.

Bystedt et al (Bystedt et al, 1980), compararon la eficacia de 4 antibióticos diferentes (azitromicina, eritromicina, clindamicina y doxiciclina) frente a un placebo, en un colectivo de estudio conformado por 140 pacientes. Los autores concluyeron que la administración de antibióticos por vía sistémica, aportaba pocas ventajas en las cirugías rutinarias de exodoncia de terceros molares, pero podrían minimizar la aparición de infecciones en caso de intervenciones traumáticas.

En 1992, Ritzau et al (Ritzau et al, 1992) prescribieron un gramo de metronidazol por vía oral preoperatoriamente como estrategia preventiva, pero no obtuvieron una reducción significativa de los porcentajes de alveolitis.

Unos años más tarde, Monaco et al (Monaco et al, 1999), en un estudio efectuado en 141 pacientes, demostraron que la administración de 2 gr diarios de amoxicilina durante los 5 días posteriores a una exodoncia, tampoco evitaban la aparición de alveolitis.

Al igual que hubo autores que se posicionaron en contra de la profilaxis antibiótica para la prevención de la alveolitis tras la exodoncia de los terceros molares, otros obtuvieron resultados favorables tanto empleando antibióticos de amplio espectro de la familia de los betalactámicos (Krekmanov y Hallander, 1980; Krekmanov, 1981) como de espectro reducido fundamentalmente metronidazol (Hedstrom, 1990; Lyall, 1991). Los estudios más recientes tampoco han proporcionado información definitiva que permita a los clínicos adoptar una decisión de forma irrefutable.

En 2004, Bergdahl y Hedstrom (Bergdahl y Hedstrom, 2004), después de efectuar exodoncias a 119 pacientes, llegaron a la conclusión de que la

administración preoperatoria de metronidazol no reducía la frecuencia de alveolitis.

Ese mismo año, Poeschl et al (*Poeschl et al, 2004*) publicaron un ensayo clínico con 288 pacientes a los que extrajeron los terceros molares mandibulares. Los participantes se distribuyeron en tres grupos: a uno le administraron amoxicilina/ácido clavulánico (500/125 mg) durante los 5 días previos a la intervención, a otro grupo clindamicina (300 mg) durante el mismo período de tiempo y al tercer grupo que sirvió como control no se le aplicó ningún tratamiento. Los resultados fueron prácticamente similares en los tres grupos.

En contra de estos resultados, otros autores sí describieron beneficios tras la administración profiláctica de antibióticos. Lacasa et al, (*Lacasa et al, 2007*) no estudiaron exclusivamente los casos de alveolitis sino los de “infección local”, comparando dos posologías diferentes de amoxicilina/ácido clavulánico a dosis de 2.000/125 mg una única dosis preoperatoria *versus* una dosis diaria durante los 5 primeros días del postoperatorio) frente a un placebo. Se registraron 4 casos de infección en el grupo con profilaxis preoperatoria, 2 casos entre los que recibieron el antibiótico durante el postoperatorio y 12 con el placebo. Arteagoitia et al (*Arteagoitia et al, 2005*) obtuvieron resultados parecidos, al comprobar la eficacia de amoxicilina/ácido clavulánico (500/125 mg) administrada durante los 4 primeros días del postoperatorio frente a un placebo, a pesar de que todos los participantes recibieron una irrigación intraalveolar con CHX al 0,12% y realizaron tres enjuagues diarios con la misma solución durante tres días.

En 2007, Kaczmarzyk (*Kaczmarzyk et al, 2007*) realizó un ensayo clínico con clindamicina, distribuyendo a los participantes en 3 grupos: al primero (A) le administró una única dosis de 600 mg de clindamicina una hora antes de la exodoncia y un placebo durante 5 días postcirugía; al segundo grupo (B) también le prescribieron 600 mg de clindamicina una hora antes de la intervención, pero se continuó el tratamiento con 300 mg de clindamicina cada 8 horas durante 5 días; al tercer grupo (C) se le proporcionó un placebo antes y otro después de la cirugía. Se produjo una reducción del número de alveolitis del 14,3% en el grupo B con respecto al 7,1% en el C, aunque hay que tener en cuenta que se trataba de una muestra muy pequeña (44 pacientes).

Ese mismo año, Halpern y Dodson (*Halpern y Dodson, 2007*) evaluaron la efectividad de una única dosis de penicilina o clindamicina (en caso de alergia a la penicilina) administrada por vía intravenosa una hora antes de la intervención y no detectaron ningún caso de alveolitis con ninguno de los 2 protocolos.

En un artículo publicado recientemente sobre este tema, se comparó la eficacia de la amoxicilina con un placebo, distribuyendo a los participantes en 3 grupos: al primero le administraron 2 gr de amoxicilina 2 horas antes de la

cirugía, al segundo 500 mg de amoxicilina cada 8 horas durante 5 días después de la exodoncia y al tercer grupo le proporcionaron un placebo; el resultado fue que no se produjo ningún caso de alveolitis en ninguno de los grupos (*López-Cedrún et al, 2011*).

También otros autores han confirmado recientemente que la administración de una única dosis de amoxicilina una hora antes de la exodoncia de un tercer molar es igual de eficaz que un placebo para prevenir la alveolitis (*Bezerra et al, 2011*), incluso cuando se administra en combinación con un corticoide (dexametasona) (*Bortoluzzi et al, 2010*).

Evalutando críticamente toda esta información, parece que existe una evidencia de nivel moderado de que la administración de profilaxis antibiótica reduce el riesgo de complicaciones infecciosas después de la exodoncia de un tercer molar. No se ha demostrado con claridad la importancia del momento de proporcionar el antibiótico (preoperatorio, postoperatorio o ambos). El número estimado de individuos sanos sometidos a la exodoncia de un tercer molar que tienen que recibir antibióticos para prevenir una infección varía entre 10 y 17, y para prevenir un caso de alveolitis varía entre 24 y 250; por lo tanto, este beneficio potencial no es suficiente para recomendar el uso sistemático de antibióticos, ya que ésta práctica aumenta el riesgo de la aparición de efectos adversos como el desarrollo de resistencias bacterianas (*Lodi et al, 2012*).

Los resultados de los trabajos más relevantes publicados hasta la fecha sobre la profilaxis de la alveolitis con antibióticos sistémicos se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Profilaxis de la alveolitis con antibióticos sistémicos

Autor (año)	Pacientes	Intervención	Resultados casos/total	Conclusiones
Curran (1974)	G1= 33	1 millón IU Penicilina G im (4 días antes a 4 después de la cirugía)	5/33	No hay diferencias estadísticamente significativas
	G2= 35	Sin profilaxis	5/35	
Barclay (1987)	G1= 45	400mg Metronidazol vo (1h antes de la cirugía y después cada 8h durante 3 días)	8/45	No hay diferencias estadísticamente significativas
	G2= 50	Placebo	17/50	
Bystedt (1980)	G1= 80	Azitromicina, Eritromicina, Clindamicina o Doxiciclina	3/80	El antibiótico puede ser eficaz sólo en exodoncias traumáticas
	G2= 60	Placebo	5/60	
Ritzau (1992)	G1= 135	1 gr Metronidazol vo (30 min. antes de la cirugía)	6/135	No hay diferencias estadísticamente significativas
	G2= 135	Placebo	5/135	
Monaco (1999)	G1= 66	2 gr Amoxicilina vo (5 días después de la exodoncia)	2/66	No hay diferencias estadísticamente significativas
	G2= 75	Sin profilaxis	4/75	
Krekmanov y Hallander (1980)	G1= 40	800mg Penicilina V antes de la exodoncia	2/40	El antibiótico reduce significativamente el número de alveolitis
	G2= 40	Sin profilaxis	13/40	
Krekmanov (1981)	G1= 50	800mg Penicilina V antes de la exodoncia	2/50	El antibiótico reduce significativamente el número de alveolitis
	G2= 48	Sin profilaxis	15/48	
Bergdahl y Hedstrom (2004)	G1= 59	1600mg Metronidazol (45min antes de la exodoncia)	10/59	No hay diferencias estadísticamente significativas
	G2= 60	Placebo	13/60	
Poeschl (2004)	G1= 176	500/125 mg AMX/CLV (5 días postexodoncia)	8/176	No hay diferencias estadísticamente significativas
	G2= 180	300 mg Clindamicina (5 días postexodoncia)	7/180	
	G3= 172	Sin profilaxis	8/172	
Lacasa (2007)	G1= 75	2.000/125 mg AMX/CLV (antes de la exodoncia)	4/75	El antibiótico reduce significativamente el número de alveolitis e infecciones
	G2= 75	2.000/125 mg AMX/CLV (5 días postexodoncia)	2/75	
	G3= 75	Placebo	12/75	
Arteagoitia (2005)	G1= 231	500/125 mg AMX/CLV (cada 8h durante 5 días postexodoncia)	0/231	No hay diferencias estadísticamente significativas
	G2= 259	Placebo	2/259	
Graziani (2005)	G1= 20	500 mg Azitromicina (3 días antes de la cirugía)	0/20	No hay diferencias estadísticamente significativas
	G2= 10	Placebo	1/10	
Kaczmarzyk (2007)	G1= 31	600mg Clindamicina (1h antes de la exodoncia)	1/31	No hay diferencias estadísticamente significativas
	G= 28	600mg Clindamicina (1h antes y durante 5 días postexodoncia)	2/28	
	G3= 27	Placebo pre- y postexodoncia	4/27	
Halpern y Dodson (2007)	G1= 59	15 UI/kg Penicilina o 600mg clindamicina iv en alérgicos (1h antes de la exodoncia)	0/59	No hay diferencias estadísticamente significativas
	G2= 59	Placebo	0/59	
López-Cedrún (2011)	G1= 39	2 grs Amoxicilina (2h antes de la cirugía)	0/39	No hay diferencias estadísticamente significativas
	G2= 44	500 mg Amoxicilina (5 días postexodoncia)	0/44	
	G3= 40	Placebo	0/40	
Bezerra (2011)	G1=34	1 gr Amoxicilina (1h antes de la exodoncia)	0/34	No hay diferencias estadísticamente significativas
	G2= 34	Placebo	0/34	

G= Grupo de tratamiento; im= vía intramuscular; vo= vía oral; iv= vía intravenosa;
AMX/CLV= Amoxicilina/Ácido Clavulánico

1.3.2. Profilaxis de las infecciones focales

1.3.2.1. Profilaxis de las infecciones cardiovasculares de origen oral con clorhexidina

Desde que en la década de los 70 se publicaron los primeros trabajos sobre la eficacia antimicrobiana de la CHX, éste ha sido el antiséptico más investigado hasta el momento en relación a su efecto en la prevalencia de bacteriemias secundarias a manipulaciones dentales, aunque los resultados reflejados en la literatura son bastante heterogéneos.

En 1984, Macfarlane et al (*Macfarlane et al, 1984*) encontraron una prevalencia de bacteriemias postexodoncia en los pacientes sometidos a irrigación del surco gingival con CHX al 1% o povidona yodada al 1% (reteniendo la solución antiséptica en la boca durante 2 minutos), significativamente inferior que en un grupo irrigado exclusivamente con suero salino (los porcentajes de hemocultivos positivos fueron 25, 40 y 80%, respectivamente); este resultado ratificó la importancia de la actividad bactericida del antiséptico frente al efecto mecánico del lavado. Al igual que otros autores, estos investigadores recomendaron la irrigación del surco gingival con clorhexidina al 1% o povidona yodada al 1% como complemento de la profilaxis antibiótica.

En 1991, Lofthus et al (*Lofthus et al, 1991*) publicaron un trabajo en el que evaluaban el efecto de la irrigación profiláctica del surco gingival con CHX al 0,12% durante 20 segundos, en la prevalencia de bacteriemias provocadas por un curetaje y alisado radicular; de los 30 participantes en el estudio (distribuidos en 3 grupos de 10), 9 presentaron hemocultivos positivos postmanipulación: 3 eran controles, 4 habían sido irrigados con agua estéril y 2 con CHX. En consecuencia, estos autores concluyeron que la irrigación subgingival con clorhexidina al 0,12% no reducía la prevalencia de bacteriemias secundarias a un curetaje y alisado radicular. Por el contrario, Allison et al (*Allison et al, 1993*) demostraron que la aplicación a nivel subgingival de una solución de CHX al 0,12% antes y durante la práctica de un curetaje subgingival con ultrasonidos, disminuía el porcentaje de bacteriemias producidas por este procedimiento.

Rahn et al (*Rahn et al, 1995*), investigaron en un grupo de 120 individuos si la irrigación del surco gingival con povidona yodada al 10% o con CHX al 0,2% condicionaba la prevalencia de las bacteriemias asociadas a determinadas manipulaciones dentales (inyección intraligamentosa o exodoncia de un molar); en este estudio, se produjo una reducción significativa en la frecuencia de bacteriemias postinyección intraligamentosa y postexodoncia después de la irrigación con povidona yodada (27%), en contraste con los resultados obtenidos tras la irrigación con agua estéril (52%) o con CHX (45%). En base a estos

hallazgos, los autores señalaron que el método más eficaz de aplicación de un antiséptico para disminuir la prevalencia de bacteriemias postmanipulación dental era la irrigación del surco gingival previa al tratamiento odontológico; coincidiendo con otros investigadores, sugirieron que la reducción en la prevalencia de bacteriemias postmanipulación dental se debía a la acción bactericida de los antisépticos más que al efecto de lavado mecánico que implica la irrigación, y que la povidona presentaba mayor actividad antiséptica que la CHX. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la povidona se aplicó a una concentración 50 veces superior a la de la CHX.

En 1996, Peter Lockhart (*Lockhart, 1996*) investigó la prevalencia y la etiología de las bacteriemias postexodoncia en un grupo de adultos sometidos a 2 enjuagues “enérgicos” consecutivos con 10 ml de hidrocloreto de CHX al 0,2%, y en otro grupo de pacientes que se enjuagaron con una solución placebo. Su principal conclusión fue que los enjuagues previos con CHX no ejercían un efecto significativo en la prevalencia de hemocultivos postexodoncia, ya que en el “grupo CHX” ésta fue del 84% y en el “grupo placebo” del 94%. Para explicar estos hallazgos, este autor señaló que el enjuague con el antiséptico no penetraba más de 3 mm en el surco gingival y en consecuencia no alcanzaba la zona crítica por la que las bacterias acceden al torrente circulatorio.

Brown et al (*Brown et al, 1998*), investigaron el efecto de un único enjuague de hidrocloreto de CHX al 0,12% en la prevalencia e intensidad de las bacteriemias secundarias a la remoción de puntos de sutura; el colectivo de estudio lo conformaron 61 pacientes a los que se efectuaron exodoncias de los terceros molares, cerrando el lecho quirúrgico con al menos 8 puntos de sutura; transcurridos 7 días, los pacientes se distribuyeron en un “grupo de control” y otro que recibió un enjuague con CHX durante 1 minuto antes de proceder a la retirada de los puntos; la prevalencia total de bacteriemias asociada a la remoción de suturas fue del 18% en el “grupo CHX” y del 15% en los controles. Los autores justificaron estos hallazgos argumentando que la práctica de enjuagues orales de carácter “activo” podía provocar bacteriemias y que la corta duración del enjuague (1 minuto) impedía que el antiséptico ejerciera su actividad antibacteriana.

Por su parte, Erverdi et al (*Erverdi et al, 2001*) investigaron la prevalencia de bacteriemias asociadas a la colocación y retirada de bandas de ortodoncia después de efectuar un enjuague con gluconato de CHX al 0,25% durante 1 minuto, contrastando los resultados con los publicados en investigaciones previas; al finalizar la inserción de las bandas, los porcentajes de hemocultivos positivos fueron 7,5% en los controles y 2,5% en los sometidos al enjuague con CHX, y tras su retirada estos porcentajes fueron 6,6% y 2,5% respectivamente.

En 2007, Tomás et al (*Tomás et al, 2007*) realizaron un estudio acerca de la prevalencia, la duración y la etiología de las bacteriemias secundarias a

exodoncias. Un total de 106 pacientes fueron distribuidos en 2 grupos: a uno se le administró un enjuague de CHX al 0,2% durante 30 segundos antes de la manipulación, mientras que al grupo control no se le proporcionó ningún tratamiento. Se recogieron muestras de sangre a los 30 segundos, 15 minutos y una hora después de la exodoncia. La prevalencia de bacteriemias en el grupo control y en el grupo CHX fue respectivamente del 96 y 79% a los 30 segundos, del 64 y 30% a los 15 minutos, y del 20 y 2% a la hora. Los autores concluyeron que el enjuague rutinario de CHX antes de una exodoncia reducía el riesgo de aparición y especialmente la duración de las bacteriemias postextracción.

Estos resultados no concuerdan con los obtenidos recientemente por Maharaj et al (*Maharaj et al, 2012*), cuando evaluaron diferentes regímenes de profilaxis antibacteriana para la prevención de bacteriemias tras una exodoncia. En el ensayo participaron 140 pacientes que se clasificaron en 4 grupos: grupo control, grupo que realizó un enjuague de 10 ml de CHX al 0,2% antes de la cirugía, grupo al que se les administraron 3 gr de amoxicilina 1 hora antes de la exodoncia, y grupo al que se les proporcionaron 600 mg de clindamicina también una hora antes. La proporción de pacientes que presentaron bacteriemias en los 4 grupos fueron respectivamente, 35, 40, 7,5 y 20%. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos amoxicilina y control, así como entre los grupos amoxicilina y CHX.

Recientemente, Barbosa et al (*Barbosa et al, 2015*) investigaron la aparición de bacteriemias postexodoncia después de la administración profiláctica de CHX. Para ello distribuyeron aleatoriamente a 201 participantes en 4 grupos de estudio: grupo control, grupo que se enjuagó con un colutorio de CHX al 0,2% antes de la manipulación dental, grupo en el que el enjuague se complementó con una irrigación subgingival con CHX al 1%, y un último grupo en el que el enjuague se complementó con una irrigación supragingival también con CHX al 1%. Sus conclusiones fueron que el enjuague con CHX reducía significativamente la duración de las bacteriemias, mientras que la irrigación limitaba su eficacia, probablemente porque esta maniobra podría provocar bacteriemias *per se*.

Los resultados de todos estos estudios sobre la eficacia antimicrobiana de la CHX para prevenir las bacteriemias después de una manipulación dental son muy heterogéneos, presumiblemente por la gran variabilidad metodológica, ya que se evalúan diferentes procedimientos odontológicos, diferentes técnicas de aplicación del antiséptico, y diferentes concentraciones y posologías de la CHX, por lo que es muy difícil comparar sus resultados.

Las propuestas de los Comités de Expertos

En 1997, la Asociación Americana de Cardiología (siglās en inglés, AHA) recomendó el uso de enjuagues con colutorios antisépticos que contuvieran CHX

o povidona yodada antes de ciertas manipulaciones dentales (*Dajani et al, 1997*). En la guía publicada en 2006 por la Sociedad Británica de Quimioterapia Antimicrobiana (siglas en inglés, BSAC), se afirmaba que “debería administrarse un enjuague preoperatorio con 10 ml de gluconato de CHX al 0,20% y que éste debía mantenerse en la boca durante un minuto” (*Gould et al, 2006*).

En contraste, en los últimos protocolos publicados en conjunto por la Sociedad Europea de Cardiología (siglas en inglés, ESC) y la Sociedad Británica de Cardiología, no se hacía referencia al uso de antisépticos (*Horstkotte et al, 2004*). En esta misma línea, en el último consenso de la Asociación Americana de Cardiología tampoco se recomendó su utilización (*Wilson et al, 2007*). El Instituto Nacional para la Excelencia Clínica del Reino Unido, destacó entre sus recomendaciones que no se debe ofrecer un enjuague bucal de CHX como profilaxis de endocarditis infecciosa a personas con riesgo de padecerla, cuando éstas se someten a un procedimiento dental (*NICE, 2008*).

En resumen, la realización de un enjuague de CHX antes de iniciar el tratamiento odontológico era una práctica recomendada por algunos comités de expertos hasta hace pocos años, aunque incomprensiblemente no se ha incluido en las últimas guías de profilaxis de la endocarditis infecciosa. Hasta la fecha no se ha demostrado que la administración de CHX pueda prevenir la endocarditis bacteriana, pero su aplicación reduce la carga bacteriana intraoral y, en consecuencia, la prevalencia y la duración de las bacteriemias secundarias a determinados procedimientos odontológicos, con la ventaja añadida de que su prescripción no tendría por qué limitarse a los pacientes de riesgo. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que el uso clínico indiscriminado de CHX puede facilitar la emergencia de nuevos clones bacterianos con susceptibilidad reducida a la CHX; además, la MHRA una agencia ejecutiva del Departamento de Salud del Reino Unido ha publicado una alerta sanitaria para productos medicinales que contengan CHX, en base al registro de numerosas reacciones anafilácticas provocadas por el empleo de este antimicrobiano (<https://assets.digital.cabinet-office.gov.uk/media/5485abd7e5274a4290000281/con197920.pdf>).

Los resultados de los trabajos más relevantes publicados hasta la fecha sobre la profilaxis de las bacteriemias secundarias a procedimientos odontológicos con clorhexidina se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Profilaxis de las bacteriemias secundarias a procedimientos odontológicos con clorhexidina (CHX)

Autor (año)	Pacientes	Intervención	Resultados casos/total	Conclusiones															
Macfarlane (1984)	G1= 20 G2= 20 G3= 20	Irrigación del surco gingival con CHX 1% Irrigación del surco gingival con PY 1% Irrigación del surco gingival con suero	5/20 8/20 16/20	CHX disminuye la prevalencia de bacteriemias (p< 0,001)															
Lofthus(1991)	G1= 10 G2= 10 G3= 10	Irrigación subgingival con CHX 0,12% Irrigación subgingival con agua estéril Ninguna irrigación	2/10 4/10 3/10	No hay diferencias estadísticamente significativas															
Allison (1993)	G1= 12 G2= 12	Irrigación subgingival con CHX 0,12% Ninguna irrigación	3/12 9/12	CHX disminuye la prevalencia de bacteriemias (p< 0,05)															
Rahn (1995)	G1= 40 G2= 40 G3= 40	Irrigación del surco gingival con CHX 0,2% Irrigación del surco gingival con PY 10% Irrigación del surco gingival con agua estéril	18/40 11/40 21/40	No existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo CHX y el control															
Lockhart (1996)	G1= 36 G2= 34	2 enjuagues con CHX 0,2% previos a una exodoncia 2 enjuagues con un placebo	31/36 31/34	Los enjuagues de CHX no reducen la prevalencia de bacteriemias															
Brown (1998)	G1= 31 G2= 24	2 enjuagues con CHX 0,12% antes de la remoción de puntos de sutura Ninguna profilaxis	4/31 2/24	No hay diferencias estadísticamente significativas															
Erverdi (2001)	G1= 40 G2= 40	Enjuague con CHX 0,2% antes de colocar bandas Enjuague con CHX 0,2% antes de retirar bandas	1/40 1/40	Prevalencia de bacteriemias similar antes y después del procedimiento															
Tomás (2007)	G1= 53 G2= 53	Enjuague con CHX 0,2% previo a una exodoncia Ninguna profilaxis	<table><tr><th></th><th>30 seg</th><th>15 min</th><th>1h</th></tr><tr><td>G1= 53</td><td>79%</td><td>30%</td><td>2%</td></tr><tr><td>G2= 53</td><td>96%</td><td>64%</td><td>20%</td></tr></table>		30 seg	15 min	1h	G1= 53	79%	30%	2%	G2= 53	96%	64%	20%	Un enjuague de CHX reduce la prevalencia de bacteriemia (p= 0,008; p< 0,001; p= 0,005)			
	30 seg	15 min	1h																
G1= 53	79%	30%	2%																
G2= 53	96%	64%	20%																
Maharaj (2012)	G1= 40 G2= 40 G3= 40 G4= 40	Enjuague con CHX 3g de Amoxicilina 600mg de Clindamicina Ninguna profilaxis	<table><tr><td>16/40</td></tr><tr><td>3/40</td></tr><tr><td>8/40</td></tr><tr><td>14/40</td></tr></table>	16/40	3/40	8/40	14/40	No existe diferencia entre el grupo control y el grupo CHX, pero sí con el de amoxicilina											
16/40																			
3/40																			
8/40																			
14/40																			
Barbosa (2015)	G1= 50 G2= 51 G3= 48 G4= 52	Enjuague con CHX 0,2% previo a una extracción Enjuague con CHX 0,2% previo a una extracción + Irrigación subgingival CHX 1% Enjuague con CHX 0,2% previo a una extracción + Irrigación supragingival CHX 1% No profilaxis	<table><tr><th></th><th>30 seg</th><th>15 min</th></tr><tr><td>G1= 50</td><td>50%</td><td>4%</td></tr><tr><td>G2= 51</td><td>55%</td><td>10%</td></tr><tr><td>G3= 48</td><td>50%</td><td>27%</td></tr><tr><td>G4= 52</td><td>52%</td><td>23%</td></tr></table>		30 seg	15 min	G1= 50	50%	4%	G2= 51	55%	10%	G3= 48	50%	27%	G4= 52	52%	23%	El enjuague de CHX no disminuye la prevalencia de bacteriemias a los 30 seg pero sí a los 15 min (p= 0,005)
	30 seg	15 min																	
G1= 50	50%	4%																	
G2= 51	55%	10%																	
G3= 48	50%	27%																	
G4= 52	52%	23%																	

G= Grupo de tratamiento; PY= povidona yodada; 30 seg, 15 min, 1 h = muestras recogidas a los 30 segundos, 15 minutos y 1 hora postmanipulación

1.3.2.2. Profilaxis de las infecciones cardiovasculares de origen oral con antibióticos sistémicos

A pesar de que la conexión entre bacteriemias secundarias a manipulaciones odontológicas y las infecciones focales se sustenta en una evidencia débil, y no existe una relación probada causal entre los procedimientos odontológicos y el desarrollo de un episodio de endocarditis bacteriana, en la primera mitad del siglo XX numerosos investigadores propusieron medidas profilácticas bien de carácter local como la cauterización o bien sistémicas como las autovacunas para prevenir las bacteriemias de origen oral. En 1955, poco después de iniciarse la producción masiva de penicilina, la Asociación Americana de Cardiología (AHA) formuló las primeras directrices sobre administración de profilaxis antibiótica previa a procedimientos quirúrgicos entre los que se incluían las manipulaciones dentales, para prevenir la endocarditis bacteriana (AHA, 1955; Little, 1998). Desde entonces, numerosos comités de expertos han planteado diferentes pautas de profilaxis, entre las que además de las de la AHA, destacan por su impacto en la comunidad clínica las propuestas de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) y las de la Sociedad Británica de Quimioterapia Antimicrobiana (BSAC).

Los protocolos de profilaxis antibiótica de la endocarditis bacteriana se han sometido a revisiones periódicas, cuya tónica general ha sido restringir progresivamente sus indicaciones, manteniendo exclusivamente las consideradas de “más alto riesgo” de generar una endocarditis (por ejemplo, la tasa de mortalidad de la endocarditis por *Streptococcus* del grupo *viridans* sobre válvula nativa se estima en un 5%, frente al 20% sobre válvula protésica) (Wilson *et al*, 2007; Habib *et al*, 2009). Los argumentos que sustentan esta política restrictiva son: por un lado, la incidencia y la mortalidad de la propia endocarditis, que no se han modificado en las últimas décadas; por otra parte, los cambios en la epidemiología de esta enfermedad, que afecta a una población más envejecida y se asocia al incremento en la utilización de técnicas invasivas, con una disminución de casos de etiología estreptocócica y un aumento de los que asientan en corazones estructuralmente normales (Moreillon y Que, 2004).

En 1960, la AHA estableció una pauta de profilaxis que consistía en la administración de varias inyecciones intramusculares de penicilina desde 48 horas antes hasta 48 horas después de la sesión de tratamiento odontológico (AHA, 1960; Little, 1998). Desde entonces, se han modificado el antibiótico de elección y la vía de administración preferente. La administración por vía intramuscular o intravenosa de antibióticos como penicilina, vancomicina o gentamicina, se han ido reemplazando gradualmente hasta llegar a la dosis oral única de amoxicilina que se propone en la actualidad (Wilson *et al*, 2007; Habib *et al*, 2009). Para los pacientes alérgicos a la penicilina, inicialmente se recomendó eritromicina por vía

oral en dosis de 250 mg cada 6 horas (AHA, 1960; Little, 1998) pero a partir de 1990 se sustituyó por clindamicina, debido a la elevada prevalencia de efectos indeseables gastrointestinales provocados por la eritromicina (Simmons, 1990).

Probablemente el principal argumento para oponerse a la administración de profilaxis antibiótica, es que hasta la fecha no se dispone de pruebas concluyentes sobre su eficacia para prevenir infecciones focales y concretamente la endocarditis bacteriana secundaria a procedimientos odontológicos en pacientes considerados “de riesgo” (Glenny *et al*, 2013).

La amoxicilina continúa siendo el fármaco de elección para prevenir las bacteriemias de origen oral en los pacientes sin antecedentes de alergia a los betalactámicos; en ensayos clínicos aleatorizados se ha demostrado que este antibiótico reduce significativamente las bacteriemias provocadas por la manipulación dental, si bien no anula la posibilidad de que éstas se produzcan (Diz Dios *et al*, 2006). Por el contrario, no existe evidencia científica concluyente, de que otros antibióticos como la clindamicina reduzcan eficazmente la prevalencia de bacteriemias secundarias al tratamiento odontológico, aunque la mayoría de los estudios realizados con modelos experimentales han confirmado la eficacia de la profilaxis en estadios tardíos del desarrollo de la endocarditis.

Otros argumentos contrarios a la administración de profilaxis son la alergia a los antibióticos beta-lactámicos y el desarrollo de resistencias bacterianas. Se ha sugerido que la administración de profilaxis con amoxicilina conlleva un riesgo elevado de reacciones alérgicas, pero realmente en la literatura se recogen muy pocos casos después de una dosis única; se estima que las reacciones alérgicas severas a la amoxicilina oral ocurren con una frecuencia de 0,9 casos por cada millón de pacientes, no conocemos ningún trabajo en el que se haya descrito una anafilaxis fatal tras la administración de amoxicilina por vía oral como profilaxis de la endocarditis y la frecuencia de reacciones adversas no-fatales se estima en torno a 22 casos por cada millón de prescripciones (Thornhill *et al*, 2015). La frecuencia de complicaciones es mucho mayor respecto a la clindamicina, con 13 reacciones fatales y 149 no-fatales por cada millón de prescripciones, en su mayoría secundarias a infecciones por *Clostridium difficile* (Thornhill *et al*, 2015).

La emergencia de resistencia a los antibióticos constituye un serio problema de salud pública; se ha demostrado que la prescripción de antibióticos podría contribuir al desarrollo, selección y transmisión de resistencia bacteriana, pero solamente después de la administración consecutiva de varias dosis.

Un último inconveniente es el relativo a los costes que la administración de profilaxis implica para el sistema de salud. Se han publicado resultados contradictorios sobre el coste/eficacia de la profilaxis antibiótica para pacientes de riesgo sometidos a tratamiento odontológico, probablemente por diferencias

sustanciales en los colectivos en los que se efectuaron las estimaciones sobre el riesgo basal de desarrollar una endocarditis (*National Institute for Health and Clinical Excellence, 2008*). En algunos países como EE.UU. se ha estimado que la profilaxis constituye un gasto considerable (*Lockhart et al, 2013*), pero sus resultados no son extrapolables a otros países como el nuestro en los que su administración a pacientes de alto riesgo sólo representa un porcentaje mínimo del total de antibióticos que prescriben los dentistas.

En el contexto de la política restrictiva de la profilaxis antibiótica, el Instituto Nacional de Salud y Excelencia Clínica del Reino Unido (NICE) publicó en 2008 una nueva propuesta que sorprendió a la comunidad científica, al plantear que “la profilaxis antibiótica de la endocarditis bacteriana no se recomendaba para personas sometidas a tratamiento odontológico” (*National Institute for Health and Clinical Excellence, 2008*). Esta idea era aplicable incluso a los pacientes de “mayor riesgo”, independientemente del tipo de procedimiento odontológico al que fueran a someterse.

Estos expertos sustentaron su recomendación sobre dos premisas principales: la primera fue la escasa evidencia disponible para determinar si la profilaxis antibiótica reduce la incidencia de endocarditis en los pacientes de riesgo; la segunda, más novedosa, fue que consideraban que ‘era biológicamente implausible que un procedimiento odontológico conllevara un mayor riesgo de endocarditis que el cepillado dental rutinario’. En este sentido, se ha confirmado el desarrollo de bacteriemias provocadas por actividades de la vida diaria como la masticación o el cepillado dental, y su prevalencia podría incluso estar subestimada, ya que es presumible que su intensidad difícilmente alcance el umbral de detección de las técnicas convencionales, pero la repercusión clínica de estas bacteriemias aún se desconoce. En una revisión sistemática reciente, hemos podido comprobar que la evidencia científica disponible a este respecto es exigua, y que la acumulación de placa bacteriana y el grado de inflamación gingival condicionan la prevalencia de bacteriemias secundarias al cepillado dental, lo que corrobora la importancia de la higiene oral como medida de prevención (*Tomás et al, 2012*).

Después de la introducción de la propuesta del NICE, en el Reino Unido se constató una reducción significativa del número de prescripciones de profilaxis antibiótica (cifrada en un 78,6%); sin embargo, en estudios de carácter preliminar, no se detectó un gran incremento en la incidencia de nuevos casos o de defunciones por endocarditis bacteriana (*Thornhill et al, 2011; Duval et al, 2012; Dayer et al, 2013*). Paradójicamente, recientemente se ha publicado un estudio epidemiológico en la prestigiosa revista *Lancet* en el que se evalúan las consecuencias de la iniciativa propuesta por NICE, en el que se concluye que “aunque no puede establecerse una relación causal, las prescripciones de

profilaxis antibiótica has disminuido sustancialmente y la incidencia de endocarditis infecciosa ha aumentado significativamente en Inglaterra desde la introducción de las recomendaciones NICE en 2008” (*Dayer et al, 2015*).

1.3.2.3. Profilaxis de las infecciones respiratorias de origen oral (neumonía nosocomial asociada a ventilación mecánica) con clorhexidina

Aproximadamente 1 de cada 3 pacientes que ingresan en una Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) requieren ventilación mecánica (VM). A pesar de que en algunas situaciones clínicas como la exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o el tratamiento de la insuficiencia respiratoria hipoxémica secundaria a edema agudo de pulmón se han propuesto algunas técnicas alternativas como la ventilación no invasiva, muchos pacientes con insuficiencia respiratoria todavía requieren intubación orotraqueal y VM (*Carvajal et al, 2010*).

El riesgo de infección es una de las complicaciones más importantes de la VM, ya que aumenta entre 6 y 10 veces las posibilidades de aparición de una neumonía (*Chastre y Fagon, 2002*). Esta complicación, denominada “neumonía asociada a ventilación mecánica” (NAVVM), continúa entorpeciendo el curso clínico del 9-67% de los pacientes con VM, con tasas de 4,4 a 22,5 casos por 1.000 días de VM (*Carvajal et al, 2010*).

Como factores de riesgo se han identificado los que contribuyen a la alcalinización gástrica, el acúmulo de secreciones en la vía aérea y la colonización bacteriana de la placa dental. Un mm³ de placa contiene más de 10⁸ bacterias, un inóculo que representa el 80% de la materia sólida de la propia placa (*Fourrier et al, 2005*). Si bien la flora oral de una persona sana se compone básicamente de microorganismos Gram positivos, en la UCI pasan a predominar los Gram negativos, y se ha observado una importante concordancia entre las bacterias aisladas en la cavidad orofaríngea y los aspirados traqueales (*Pineda et al, 2006*).

La colocación del tubo endotraqueal disminuye el reflejo tusígeno asociado al empleo de sedo-analgésia y éste unido a que el aire administrado artificialmente no está caliente ni húmedo, dificulta considerablemente la depuración mucociliar y propicia la colonización de la orofaringe y el tracto gastrointestinal, favoreciendo la aparición de NAVVM (*Tantipong et al, 2008*).

Se han publicado diferentes guías de práctica clínica de medidas preventivas, en las que no existe una recomendación unánime sobre higiene oral en los pacientes sometidos a ventilación mecánica (*Tablan et al; 2004; Adalja, 2010; Torres y Carlet, 2001*). Diversas revisiones sistemáticas sobre el empleo rutinario de CHX en los cuidados orales para prevenir la NAVVM han arrojado resultados heterogéneos (*Pineda et al, 2006; Chan et al, 2007; Chlebicki y Safdar,*

2007; Kola y Gastmeier, 2007). No obstante, en la literatura no hemos encontrado una guía consensuada con respecto a cómo se debe realizar la higiene oral de forma óptima, ni en cuanto a la forma de presentación, concentración o frecuencia de aplicación de este antiséptico (Zamora-Zamora, 2011).

En 1996, De Riso et al (*DeRiso et al, 1996*) intentaron demostrar la eficacia de la CHX en la reducción de la prevalencia de infecciones respiratorias nosocomiales en pacientes sometidos a cirugía cardíaca. El grupo experimental constaba de 173 pacientes, a los que se aplicó un enjuague preoperatorio con 15 ml de CHX al 0,12% y enjuagues postoperatorios 2 veces al día hasta que abandonaban la UCI o fallecían. Al grupo control conformado por 180 pacientes se le aplicó una sustancia placebo (agua mentolada, sacarina sódica, FD&c azul N°. 1 y alcohol etílico 3,2%), con la misma posología. Los resultados de este estudio demostraron una reducción en la frecuencia de infecciones nosocomiales de un 65% en el grupo tratado con CHX (8 casos/173 pacientes *versus* 24 casos/180 pacientes; $p < 0,01$). Aunque al analizar exclusivamente los casos de neumonía no se alcanzó una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes sometidos a enjuagues con CHX o placebo (3 casos/173 pacientes *versus* 9 casos/180 pacientes, respectivamente; $p > 0,05$). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en lo que se refiere al número de días de hospitalización (7,9 *versus* 8,5 días), pero sí en la mortalidad (1,16 *versus* 5,56%; $p < 0,05$).

En el año 2000, Fourrier et al (*Fourrier et al, 2000*) publicaron un estudio con 60 pacientes ingresados en la UCI sometidos a VM, a los que distribuyeron en 2 grupos: a 30 pacientes les aplicaron un gel de CHX al 0,2% para desinfectar la cavidad oral con una frecuencia de 3 veces al día, mientras el paciente permaneciera en la UCI, y a los 30 pacientes restantes se les realizaron cuidados orales estándar (suero isotónico y bicarbonatado, 4 veces al día). Se constató una disminución en la frecuencia de NAVM (5 casos/30 pacientes *versus* 15 casos/30 pacientes, respectivamente; $p < 0,05$), pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad, en el período de estancia en la UCI, ni en los días que los pacientes permanecieron con VM.

En 2002, Houston et al (*Houston² et al, 2002*) trataron de comprobar si la disminución de la concentración de bacterias en la orofaringe podría reducir la prevalencia de neumonías nosocomiales. Para ello efectuaron un estudio en 561 pacientes ingresados en la UCI que fueron sometidos a cirugía cardíaca; a 270 les realizaron un enjuague preoperatorio y después de la cirugía 2 enjuagues al día con 15 ml de CHX durante 10 días; a los 291 restantes, se les aplicó un enjuague con aceites esenciales con la misma posología. Los autores no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de NAVM entre ambos grupos (4 casos/270 pacientes *versus* 9 casos/291 pacientes), pero sí en

relación con el tiempo de intubación (2 casos en 10 pacientes intubados menos de 24 horas, frente a 7 casos en 10 pacientes intubados más de 24 horas; $p=0,02$).

En un estudio publicado en el año 2004 en el que participaron 179 pacientes, Macnaughton et al (*Macnaughton et al, 2004*) observaron que no había diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de neumonías entre los pacientes intubados que se enjuagaban con CHX al 0,2% cada 12 horas y los que utilizaban un placebo.

En 2005, Fourrier et al (*Fourrier et al, 2005*) repitieron la investigación que habían efectuado en 2002; esta vez a los pacientes del grupo control se les aplicó un gel de características similares al del grupo de estudio pero sin CHX. La prevalencia de infecciones nosocomiales fue del 17,5% (13,2 casos por 1.000 días en la UCI) en el grupo placebo y del 18,4% (13,3 casos por 1.000 días en la UCI) en el grupo tratado con CHX. No existieron diferencias significativas en la frecuencia de NAVM, en la tasa de mortalidad, ni en los días de estancia en la UCI. Sin embargo, el número positivo de aislamientos en muestras de placa bacteriana obtenidas el día 10 fue significativamente menor en el grupo tratado con CHX (29 % *versus* 66 %; $p<0,05$); posiblemente este hallazgo pueda justificarse por la enorme resistencia de algunas especies identificadas en las NAVM como *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* o *Enterobacterias*.

Koeman et al (*Koeman et al, 2006*), investigaron en un grupo de 385 pacientes si la descontaminación oral con CHX al 2% o con CHX-colistina al 2%, podían reducir el número de NAVM. Cuando los pacientes llevaban intubados más de 48 horas, los distribuyeron en 3 grupos (CHX, CHX-colistina y placebo) a los que aplicaron cada 6 horas un gel con el principio activo correspondiente. Se detectó una reducción de la frecuencia de NAVM en relación con la administración de CHX (CHX *versus* placebo= 65% de reducción, $p=0,012$; CHX-colistina *versus* placebo= 55% de reducción, $p=0,030$); la CHX fue más eficaz para Gram-positivos, mientras que la combinación CHX-colistina resultó eficaz tanto frente a Gram-positivos como a Gram-negativos. No hubo diferencias en la duración de la VM ni en los días de estancia en la UCI.

En 2006, Segers et al (*Segers et al, 2006*) estudiaron la eficacia de la descontaminación naso- y orofaríngea con gluconato de CHX, para prevenir infecciones nosocomiales en pacientes sometidos a cirugía cardíaca. A los participantes se les administraba aleatoriamente un enjuague y un ungüento nasal con gluconato de CHX al 0,12% o bien un placebo; la aplicación se realizaba cada 6 horas durante 10 días o hasta que se daba el alta médica al paciente. El porcentaje de infecciones nosocomiales en el grupo CHX y en el grupo placebo fue de 19,8% y 26,2%, respectivamente ($p=0,002$).

Sólo 2 años más tarde, Tantipong et al (*Tantipong et al, 2008*) también quisieron demostrar la eficacia de la descontaminación oral como profilaxis de la NAVM, empleando para ello una solución de CHX al 2% administrada 4 veces al día, después de efectuar un cepillado dental y una aspiración de secreciones; se estableció un grupo placebo, que fue tratado de la misma forma pero con una solución salina. Se incluyeron un total de 102 pacientes en el grupo con CHX y de 105 en el grupo con solución salina, demostrándose una reducción en la tasa de NAVM de 21 a 7 casos por 1.000 días de VM ($p= 0,04$). La prevalencia de NAVM en el grupo CHX fue de 4,9% (5 casos/102 pacientes) y en el grupo placebo fue de 11,4% (12 casos/105 pacientes).

En 2009, Panchabhai et al (*Panchabhai et al, 2009*) compararon la eficacia de 2 antisépticos para prevenir la NAVM. A un grupo de 88 pacientes le administraron 10 ml de CHX al 0,2% cada 12 horas y a otro grupo de 82 le prescribieron 10 ml de permanganato potásico también 2 veces al día. Los autores concluyeron que no existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en el número de episodios de NAVM, en la duración de la estancia en la UCI, ni en la mortalidad.

Ese mismo año, Scannapieco et al (*Scannapieco et al, 2009*) analizaron el efecto de la CHX al 0,12% para reducir la colonización por patógenos, en pacientes intubados en la UCI. A 58 pacientes se les aplicó CHX 1 vez al día, a otros 58 pacientes 2 veces al día y un grupo control formado por 59 pacientes recibieron un placebo (solución con sabor y consistencia similares) 2 veces al día. No encontraron diferencias estadísticamente significativas en la reducción del número de neumonías (14 casos/116 pacientes que recibieron CHX *versus* 12 casos/59 pacientes que recibieron placebo; $p= 0,14$).

Bellissimo-Rodrigues et al (*Bellissimo-Rodrigues et al, 2009*), en un estudio con 194 participantes intubados en los que evaluaron la eficacia de la CHX al 0,12% administrada 3 veces al día para prevenir la aparición de neumonías, demostraron que no había diferencias con respecto a una sustancia placebo (16 casos/98 pacientes con CHX *versus* 17 casos/96 controles con placebo; $p= 0,78$).

Una aportación interesante es la de Grap et al (*Grap et al, 2011*), en un estudio efectuado en 145 pacientes accidentados que iban a ser intubados. A 71 se les aplicó en una única ocasión CHX al 0,12% mediante una gasa empapada con 5 ml del antiséptico y los 74 restantes constituyeron el grupo control (sin medidas de profilaxis). El 55,6% de los controles desarrolló una NAVM a las 48-72 horas, frente al 33,3% de los pacientes que recibieron la CHX. En consecuencia, los autores de este trabajo concluyeron que la administración precoz de una única dosis de CHX en la cavidad oral reducía significativamente las infecciones respiratorias y por consiguiente la aparición de NAVM.

Ozçaka et al (*Ozçaka et al, 2012*) diseñaron un trabajo para comprobar si limpiando la boca con una gasa empapada en CHX al 0,2% a los pacientes ingresado en la UCI, disminuía el riesgo de padecer NAVM. El grupo de estudio lo conformaron 61 pacientes, a los que se limpiaba la boca 4 veces al día con CHX al 0,2% o con suero salino (controles). La frecuencia de neumonías fue significativamente mayor en el grupo control que en el grupo CHX (68,8% y 41,4%, respectivamente; $p=0,03$)

En el año 2013, Khezri et al (*Darvishi Khezri et al, 2013*) compararon el efecto antibacteriano del gluconato de CHX al 0,2% con un preparado a base de hierba matricaria (extracto de camomila) al 10%, con Persica® al 10% y con una solución salina fisiológica, en pacientes con ventilación mecánica. Los resultados demostraron una diferencia estadísticamente significativa a favor de la CHX, aunque también se produjo una reducción en el número de colonias bacterianas al emplear otros agentes, especialmente el Persica®.

En un ensayo clínico realizado en Buenos Aires por Nicolosi et al (*Nicolosi et al, 2014*), se demostró la importancia de la descontaminación oral con CHX para prevenir la NAVM en pacientes sometidos a cirugía cardíaca. Los participantes se distribuyeron en 2 grupos de 150 pacientes cada uno: al primero se le aplicó un protocolo específico de higiene oral controlado por un dentista, así como enjuagues con CHX cada 12 horas durante los 3 días previos a la cirugía; al segundo grupo no se le aplicó el protocolo de descontaminación oral. En los pacientes que recibieron CHX se produjo una reducción significativa de la prevalencia de neumonías y de la duración de la estancia hospitalaria.

En un trabajo publicado muy recientemente, Munro et al (*Munro et al, 2015*), analizaron la importancia de la aplicación de una solución oral de 5 ml de CHX al 0,12% antes de la intubación en un importante colectivo de estudio (157 pacientes recibieron CHX y 157 eran controles). Sus resultados demostraron que si los pacientes recibían CHX de forma rutinaria una vez intubados, la frecuencia de infecciones asociadas a VM era independiente de si se administraba o no una única dosis de CHX preintubación, contradiciendo los resultados obtenidos unos años antes por este mismo grupo (*Grap et al, 2011*).

Los resultados de los trabajos más relevantes publicados hasta la fecha sobre la profilaxis de las infecciones respiratorias de origen oral tratados con CHX se detallan en la tabla 4.

Tabla 4. Profilaxis de las infecciones respiratorias de origen oral (neumonía nosocomial asociada a ventilación mecánica) con clorhexidina (CHX)

Autor (año)	Pacientes	Intervención	Resultados casos/total	Conclusiones
De Riso (1996)	G1= 173	Enjuagues con CHX 0,12% /12 horas antes y después de ser intubado	3/173	CHX disminuye la prevalencia de infecciones respiratorias (p< 0,01)
	G2= 180	Placebo (alcohol 3,2%/ 12 horas)	9/180	
Fourrier (2000)	G1= 30	Gel de CHX 0,2%/8 horas durante estancia en UCI	4/30	CHX disminuye la prevalencia de infecciones respiratorias (p< 0,05)
	G2= 30	Cuidados básicos (enjuagues bicarbonato)	11/30	
Houston (2002)	G1= 270	Enjuagues de CHX 0,12%/12 horas antes y después de la cirugía	4/270	Eficacia similar de CHX y aceites esenciales (p= 0,21)
	G2= 291	Igual pero con Aceites esenciales	9/291	
Macnaughton (2004)	G1= 91	CHX 0,2%/12 horas	32/91	No hay diferencias estadísticamente significativas
	G2= 88	Placebo	28/88	
Fourrier (2005)	G1= 114	Gel de CHX 0,2%/8 horas	13/114	No hay diferencias estadísticamente significativas
	G2= 114	Placebo	12/114	
Koeman (2006)	G1= 127	CHX 2% en pasta/8 horas	13/127	CHX disminuye la prevalencia de infecciones respiratorias (p= 0,01)
	G2= 130	Placebo	23/130	
Segers (2006)	G1= 485	CHX 0,12% nasal y oral durante 30seg/6 horas	45/485	CHX disminuye la prevalencia de infecciones respiratorias (p= 0,002)
	G2= 469	Placebo	74/469	
Tantipong (2008)	G1= 102	CHX 2%/6 horas+cepillado dientes	5/102	No hay diferencias estadísticamente significativas
	G2= 105	Solución salina	12/105	
Panchabhai (2009)	G1= 88	CHX 0,2%/12 horas	14/88	No hay diferencias estadísticamente significativas
	G2= 83	Permanganato potásico 0,01%/12 horas	15/83	
Scannapieco (2009)	G1= 116	CHX 0,12%/12-24 horas	14/116	CHX disminuye la prevalencia de la NAVM
	G2= 59	Placebo	12/59	
Bellísimo-Rodriguez (2009)	G1= 64	CHX 0,12%/8 horas+cepillado dientes	16/64	No hay diferencias estadísticamente significativas
	G2= 69	Placebo	17/69	
Grap (2011)	G1= 71	Única dosis de CHX 0,12% aplicada con una gasa 12h antes de intubar	7/21	CHX disminuye la prevalencia de la NAVM
	G2= 74	Cuidados orales básicos	10/18	
Ozcaka (2012)	G1= 29	Limpieza oral con una gasa empapada en CHX 0,2%/6 horas	12/29	CHX disminuye la prevalencia de infecciones respiratorias (p= 0,03)
	G2= 32	Suero salino	22/32	
Darvishi Khezri (2013)	G1= 20	Enjuagues de CHX 0,2%	Recuento bacteriano; no evaluaron infecciones respiratorias	El enjuague con CHX 0,2% es la alternativa más eficaz en la prevención de NAVM
	G2= 20	Solución de hierbas matricaria 10%		
	G3= 20	Solución de hierbas Persica® 10%		
	G4= 20	Enjuagues con suero fisiológico		
Nicolosi (2014)	G1= 150	Enjuagues con CHX 0,12% y cepillado de dientes por un profesional, desde 3 días antes de la cirugía	4/150	CHX disminuye la prevalencia de infecciones respiratorias (p= 0,04)
	G2= 150	Cuidados orales básicos	13/150	

G= Grupo de tratamiento; NAVM= Neumonía nosocomial Asociada a Ventilación Mecánica

1.3.2.4. Profilaxis de las infecciones respiratorias de origen oral (neumonía nosocomial asociada a ventilación mecánica) con antibióticos

Las infecciones que se desarrollan en las UCIs, especialmente las neumonías, representan una importante complicación en la evolución de los pacientes médicamente comprometidos, ya que aumentan considerablemente su morbi-mortalidad. La prevalencia de neumonías en este contexto, varía entre un 7 y un 40% (*Chevret et al, 1993; Fagon et al, 1993*). La tasa de mortalidad por neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVIM) puede exceder el 50%, aunque estas muertes no siempre pueden atribuirse directamente a la neumonía, ya que en ocasiones responden al deterioro sistémico del paciente.

Se han evaluado diferentes estrategias para reducir las infecciones del tracto respiratorio y una de las más recurridas es la “descontaminación selectiva del tracto digestivo” (*Rocha et al, 1992; Verwaest et al, 1997; Krueger et al, 2002; de Jonge et al, 2003; de Smet et al, 2009*). Básicamente se trata de un método diseñado para prevenir la infección pulmonar, erradicando las bacterias potencialmente patógenas de la orofaringe, el estómago y el intestino por medio de antibióticos aplicados tópicamente en la orofaringe y a través de un tubo nasogástrico; además, en algunos protocolos también se incorporan antibióticos sistémicos. Esta estrategia profiláctica ha generado mucho interés, ya que tras su aplicación los resultados de numerosos estudios han evidenciado una disminución de la incidencia de neumonías (*de Jonge et al, 2003, de Smet et al, 2009*) e incluso del número de decesos (*Krueger et al, 2002*). Sin embargo, esta propuesta no está exenta de cierta controversia, ya que tanto el riesgo potencial de inducir resistencias bacterianas como la laboriosidad del procedimiento, continúan generando la oposición de muchos expertos (*Hammond et al, 1992; Verwaest et al, 1997; Lingnau et al, 1998; Heininger et al, 2006*).

La primera experiencia clínica en la descontaminación selectiva del tracto digestivo fue publicada en 1983 por Stoutenbeek et al (*Stoutenbeek et al, 1984*), aunque el primer estudio randomizado también obra del mismo grupo de investigadores no se divulgó hasta 1987 (*Stoutenbeek et al, 1987*); en este trabajo, se evaluó el efecto de la descontaminación selectiva del tracto digestivo aplicando en la orofaringe y por vía enteral antibióticos de administración tópica como polimixina E, tobramicina y anfotericina B, complementados con 50-100 mg/kg/día de cefotaxima por vía intravenosa durante 5 días. El objetivo perseguido era erradicar selectivamente los microorganismos patógenos sin alterar la flora anaerobia.

En 1991, Pugin et al (*Pugin et al, 1991*) llevaron a cabo un ensayo en el que evaluaron la descontaminación selectiva de la orofaringe en un grupo de 52

pacientes que requerían ventilación mecánica, aplicando cada 6 horas sulfato de polimixina B, sulfato de neomicina y vancomicina frente a un placebo. La aparición de neumonías fue mucho menos frecuente en el grupo tratado con antibióticos (16% *versus* 78%) pero no hubo diferencias en la mortalidad. También se observó que en el grupo experimental se prescribieron muchos menos antibióticos sistémicos y por lo tanto se redujo potencialmente el número de resistencias bacterianas.

Casi de forma coetánea, Hammond et al (*Hammond et al 1992*) también evaluaron la descontaminación selectiva del tracto digestivo, pero combinando antibióticos tópicos (aplicados en la orofaringe y por vía enteral) y sistémicos. Sus resultados fueron muy discutidos, ya que se produjo una reducción en la prevalencia de infecciones secundarias pero no disminuyó la morbi-mortalidad, por lo que se cuestionó la eficacia de esta práctica en términos de riesgo-beneficio.

Ese mismo año, Gastinne et al (*Gastinne et al, 1992*) publicaron un estudio en 445 pacientes ingresados en la UCI que precisaban ventilación mecánica. Al grupo experimental se les aplicó una combinación de tobramicina, polimixina E y anfotericina B por vía tópica en la orofaringe y por vía enteral, durante todo el período de intubación; al grupo control se le administró un placebo. Los autores concluyeron que no existían diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de neumonías entre ambos grupos.

Esos resultados coinciden con los obtenidos por Wiener et al (*Wiener et al, 1995*), cuando compararon la eficacia de un preparado a base de polimixina E, gentamicina y nistatina frente a un placebo, concluyendo que la descontaminación selectiva no aportaba beneficios a los pacientes intubados en la UCI.

En 1997, se realizó un estudio muy relevante en un colectivo de 660 pacientes que precisaron ventilación mecánica al menos durante 48 horas, a los que se distribuyó en 3 grupos: al primero (grupo A) no se le aplicó ningún tipo de profilaxis; al segundo (grupo B), ofloxacino y anfotericina B por vía oral y enteral; al grupo C, polimixina E, tobramicina y anfotericina B. Además, el grupo C recibió ofloxacino y el C cefotaxima, ambos por vía sistémica y durante 4 días. Se detectó una reducción estadísticamente significativa del número de infecciones en los grupos B y C con respecto al A, pero los autores concluyen que también se produjo un aumento de las resistencias bacterianas (*Verwaest et al, 1997*).

Otros autores como Bergmans et al (*Bergmans et al, 2001*), decidieron simplemente realizar una descontaminación a nivel local. Para ello, aplicaron una profilaxis antibiótica por vía tópica con gentamicina, colistina y vancomicina en la orofaringe de 87 pacientes; la aplicación se iniciaba a las 24 horas de la intubación y se realizaba 4 veces al día hasta un máximo de 21 días, salvo extubación previa

o en su caso el fallecimiento del paciente. El grupo control, lo conformaron 139 pacientes que se distribuyeron en 2 grupos: el primero (control A) recibió un placebo (sin antibióticos); el segundo grupo (control B), ingresado en otra UCI diferente, no recibió ningún tipo de tratamiento. El hallazgo más relevante fue que se observaron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de NAVM entre el grupo de estudio y los controles.

Por el contrario, Rocha et al (*Rocha et al, 1992*) compararon la eficacia combinada de los antibióticos por vía tópica y sistémica. Para ello, administraron 6 g/día de cefotaxima por vía parenteral los primeros 4 días post-intubación junto con un preparado a base de polimixina E, tobramicina y amfotericina B, y lo compararon frente a un placebo. Obtuvieron resultados favorables en el grupo antibiótico pero subrayaron la necesidad de efectuar continuos controles bacteriológicos.

Utilizando esta misma combinación antibiótica, en Ámsterdam se diseñó un ensayo aleatorizado para evaluar la aparición de resistencias a los antibióticos, que se completó con un seguimiento de más de 2 años después de finalizado el tratamiento; se demostró que la profilaxis reducía la mortalidad en la UCI y la colonización por bacterias aerobias Gram-negativas; ningún paciente fue colonizado por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, sólo un 1% lo fue por *Enterococcus spp.* resistente a vancomicina, y un 16% y 26% (en descontaminación selectiva del tracto digestivo y controles, respectivamente) se aislaron bacterias Gram negativas resistentes a cefotaxima, ciprofloxacino, polimixina E y tobramicina (*De Jonge, 2003*).

Krueger et al (*Krueger et al, 2002*), realizaron un estudio donde combinaron una profilaxis antibiótica por vía tópica y por vía intravenosa, para evaluar la incidencia de infección, la disfunción orgánica y la mortalidad, en personas ingresadas en la UCI como consecuencia de un procedimiento quirúrgico o de un traumatismo. Los pacientes recibieron 2 dosis diarias de ciprofloxacino durante 4 días, junto con un preparado tópico de gentamicina y polimixina por vía oral, nasal y enteral 4 veces al día durante toda su estancia en la UCI. El resultado más relevante es que hubo una reducción importante en la incidencia de infecciones, especialmente de las NAVM.

En 2009, Liberati et al (*Liberati et al, 2009*) publicaron una revisión sistemática donde concluyeron que un protocolo basado en una combinación de antibióticos tópicos y sistémicos, reducía la aparición de infecciones en las vías respiratorias y la mortalidad en general.

Recientemente, Silvestri et al (*Silvestri et al, 2014*), después de realizar una revisión sistemática con metaanálisis sobre la descontaminación selectiva del tracto digestivo con CHX en pacientes quirúrgicos ingresados en cuidados

críticos, concluyeron que esta práctica reducía la frecuencia de NAVM y las neumonías nosocomiales, pero sin afectar a la mortalidad. En consecuencia, en términos de riesgo-beneficio, no se han aclarado definitivamente las ventajas de los antibióticos frente a los antisépticos tópicos como la CHX.

Los resultados de los trabajos más relevantes publicados hasta la fecha sobre la profilaxis de las infecciones respiratorias de origen oral tratadas con antibióticos se detallan en la tabla 5.

Tabla 5. Profilaxis de las infecciones respiratorias de origen oral (neumonía nosocomial asociada a ventilación mecánica) con antibióticos. Descontaminación selectiva del tracto digestivo

Autor (año)	Pacientes	Intervención	Resultados casos/total	Conclusiones
Stoutenbeek (1987)	G1= 63 G2= 59	Polimixina E + Tobramicina + Anfotericina B vo/ve + Cefotaxima iv Cefotaxima iv	5/63 12/59	La combinación de antibióticos es más eficaz que la cefotaxima sola ($p < 0,001$)
Rodríguez-Roldan (1990)	G1= 13 G2= 15	Desinfección + Polimixina E + Tobramicina o Netilmicina + Anfotericina B (cada 6 horas) Desinfección y un placebo	0/13 11/15	Existe una diferencia estadísticamente significativa $p < 0,001$
Pugin (1991)	G1= 25 G2= 27	Polimixina B + Neomicina + Vancomicina + Dextrosa 5% (cada 4 horas) Dextrosa 5%	4/25 21/27	Hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$)
Hammond (1992)	G1= 114 G2= 125	Polimixina E + Tobramicina + Anfotericina B vo/ve + Cefotaxima iv Placebo + Cefotaxima iv	30/114 43/125	La eficacia de la combinación de antibióticos fue similar a la de la cefotaxima sola
Gastinne (1992)	G1= 220 G2= 225	Tobramicina + Anfotericina B + Polimixina E vo/ve Placebo	26/220 33/225	No hay diferencias estadísticamente significativas
Rocha (1992)	G1= 47 G2= 54	Polimixina E + Tobramicina + Anfotericina B vo/ve + Cefotaxima iv Placebo	Sólo evaluaron infecciones respiratorias	Hubo diferencias estadísticamente significativas $p < 0,001$
Laggner (1994)	G1= 33 G2= 34	Gentamicina + Anfotericina B (cada 6 horas) + gel desinfectante + Aminopenicilina + Ácido clavulánico Igual al anterior pero en lugar de la Gentamicina un placebo	1/33 4/34	Existe una disminución pero no es estadísticamente significativa
Wiener (1995)	G1= 30 G2= 31	Solución de Polimixina E + Gentamicina + Nistatina cada 6 horas Placebo	8/30 8/31	No hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos
Verwaest (1997)	G1= 220 G2= 220 G3= 220	No profilaxis Ofloxacino + Anfotericina B vo/ve + Ofloxacino iv Polimixina E + Tobramicina + Anfotericina B + Cefotaxima iv	Sólo evaluaron infecciones respiratorias	Existe una reducción importante del nº de infecciones respiratorias pero aumenta el nº de resistencias bacterianas
Bergmans (2001)	G1= 87 G2= 78 G3= 61	Orabase con Polimixina E + Gentamicina + Vancomicina (cada 6 horas) Orabase con placebo Ningún tratamiento de profilaxis	9/87 24/78 14/61	Existe una reducción importante en el nº de NAVM de los pacientes tratados con respecto a los controles
Pneumatikos (2002)	G1= 30 G2= 31	Polimixina E + Tobramicina + Anfotericina B Solución placebo	5/30 16/31	Hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$)

1. INTRODUCCIÓN

Autor (año)	Pacientes	Intervención	Resultados casos/total	Conclusiones
Krueger (2002)	G1= 265 G2= 262	Polimixina B + Gentamicina vo/ve/vn cada 6 horas + Ciprofloxacino iv Placebo	NE	NE
De Jonge (2003)	G1= 466 G2= 468	Polimixina E + Tobramicina + Anfotericina B vo/ve + Cefotaxima iv Ningún tratamiento de profilaxis	61/378 104/395	Hay diferencias estadísticamente significativas (p= 0,001)
Stoutenbeek (2007)	G1= 201 G2= 200	Polimixina E + Tobramicina + Anfotericina B vo/ve (cada 6 horas) + Cefotaxima Profilaxis antibiótica estándar que se aplica en cada centro	62/201 100/200	Disminución de infecciones respiratorias (30% vs 50%); sin diferencias significativas en la mortalidad
De Smet (2009)	G1= 2045 G2= 1904 G2= 1990	Polimixina E + Anfotericina B + Tobramicina (cada 6 horas) + Cefotaxima iv (durante 4 días) en orofaringe y estómago (DTD) Igual al anterior pero sólo en orofaringe (DSO) Cuidados orales básicos	No estudiaron NAVM	Reducción importante en la mortalidad de los pacientes ingresados en UCI al realizarle DSO

G= Grupo de tratamiento; iv= vía intravenosa; vo= vía oral; ve= vía enteral; vn= vía nasal; DTD= Descontaminación del Tracto Digestivo; DSO= Descontaminación Selectiva de la Orofaringe; NAVM= Neumonía nosocomial Asociada a Ventilación Mecánica; NE= no especificado







2. OBJETIVOS



1. Evaluar *in situ* la actividad antimicrobiana de la clorhexidina al 0,20% administrada en enjuagues con una posología convencional (cada 12 horas), sobre las bacterias del biofilm oral.
2. Evaluar *in situ* la actividad antimicrobiana de la clorhexidina al 0,20% administrada en enjuagues con una nueva posología (cada 8 horas), sobre las bacterias del biofilm oral.
3. Evaluar *in situ* la actividad antimicrobiana de la combinación antibiótica amoxicilina-ácido clavulánico (500/125mg) administrada por vía oral con una posología convencional (cada 8 horas), sobre las bacterias del biofilm oral.







3. MATERIAL Y MÉTODOS



3.1. SELECCIÓN DEL GRUPO DE ESTUDIO

El grupo de estudio lo conformaron 20 voluntarios adultos con edades comprendidas entre 25 y 55 años que presentaban un buen estado de salud oral: mínimo de 24 dientes permanentes, sin evidencia de gingivitis ni periodontitis (Índice Periodontal Comunitario= 0) (*World Health Organization, 1997*), y ausencia de caries activas. Los criterios de exclusión aplicados fueron: fumar, ser portador de prótesis dentales o aparatos ortodóncicos, haber recibido antibióticos o utilizado de forma rutinaria antisépticos orales durante los últimos 3 meses, y padecer alguna enfermedad sistémica o recibir alguna medicación que pueda provocar una alteración en la producción y/o en la composición de la saliva. También se excluyeron a las personas con antecedentes de hipersensibilidad o intolerancia a CHX o a amoxicilina/ácido clavulánico (AMX-CLV). Previamente al inicio del estudio, a todos los participantes se les efectuó una tartrectomía.

En todos los casos se obtuvo por escrito el consentimiento informado de los participantes en el estudio. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Santiago de Compostela, en el marco del proyecto PGIDIT05PXIB92501PR (Xunta de Galicia).

3.2. COLECCIÓN Y ANÁLISIS DEL BIOFILM DE PLACA DENTAL

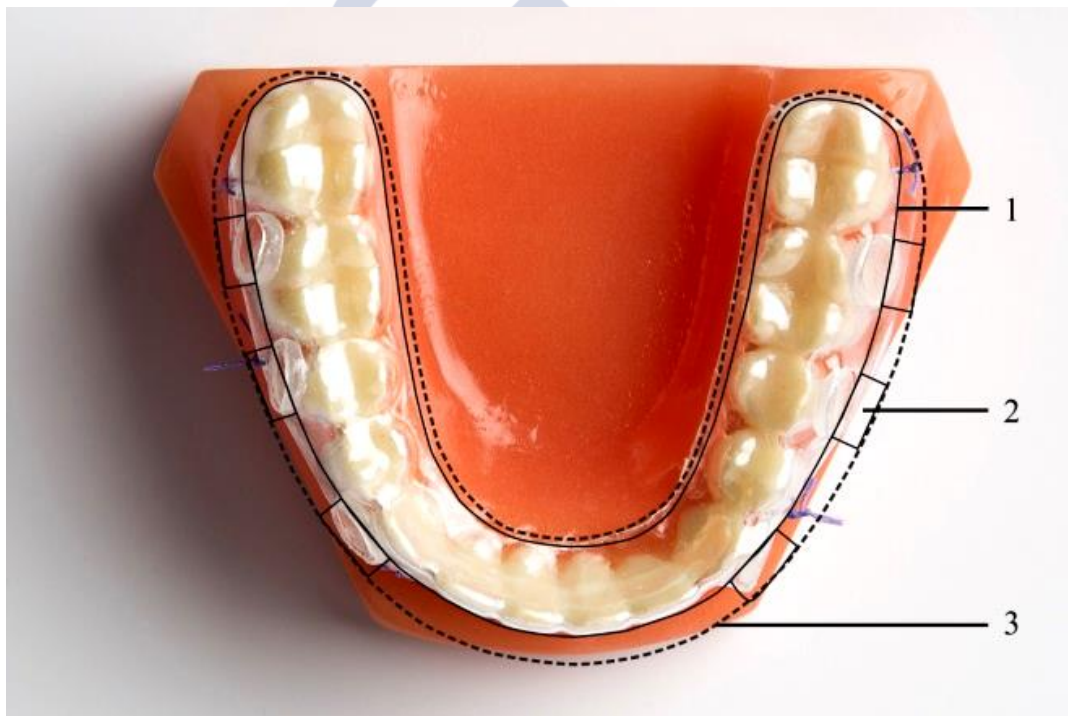
3.2.1. Confección de una férula porta-discos individualizada

A cada participante del grupo de estudio se le confeccionó una férula individualizada de la arcada inferior para albergar 6 discos de cristal (6 mm de diámetro y 1 mm de grosor) pulidos a 4000 grid. Esta férula consta de 2 planchas de vinilo. La interna tiene 1 mm de grosor y es la que proporciona retención y soporta los discos, mientras que la externa es de 0,5 mm de grosor y está fenestrada para permitir el contacto de la superficie vestibular de los discos con la saliva, a la vez que éstos se encuentran protegidos de la acción de las mejillas y la lengua (Figura 1).

Se colocaron 3 discos en una hemiarcada y los 3 restantes en la contralateral. El disco 1 o anterior se colocó entre la porción distal del canino y la mesial del primer premolar; el disco 2 o medio entre la distal del segundo premolar y la mesial del primer molar; el disco 3 o posterior entre la distal del primer molar y la mesial del segundo molar (Figura 2).

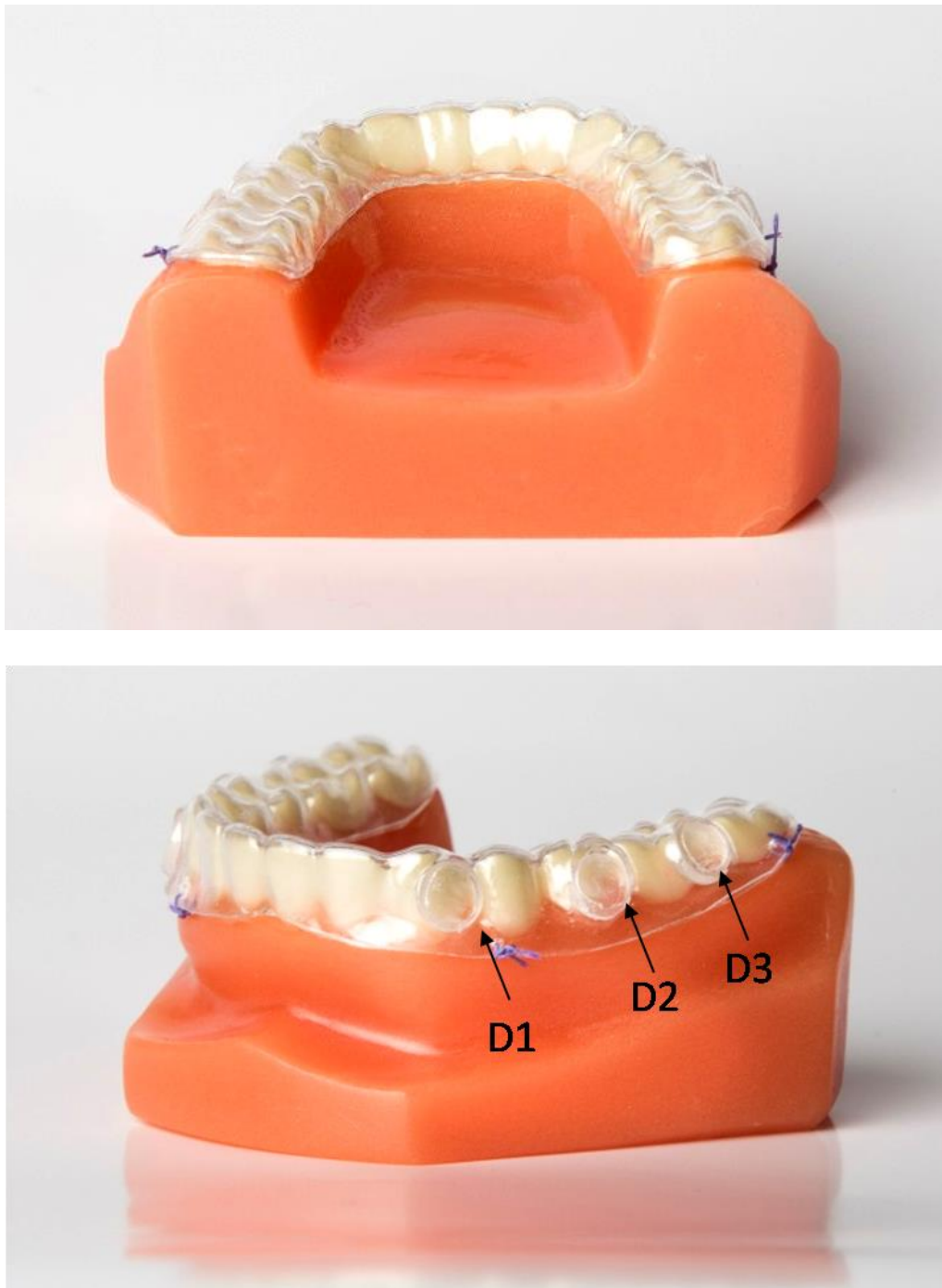
Durante 4 días, cada voluntario portó la férula con los discos de cristal para favorecer el crecimiento del biofilm bacteriano (Figura 3), retirándola de la cavidad oral únicamente durante las comidas (tiempo durante el cual la férula permanecía en una solución salina fisiológica estéril) y para efectuar maniobras de higiene oral (basadas exclusivamente en la remoción mecánica de la placa bacteriana sin el empleo de ninguna pasta dentífrica o colutorio).

Figura 1. Diseño de la férula doble porta-discos de cristal



- 1- Férula interna en contacto con la arcada dentaria inferior.
- 2- Disco de cristal.
- 3- Férula externa fenestrada en el área de los discos.

Figura 2. Imagen de la férula porta-discos individualizada



- D1 (Disco 1): Colocado entre la porción distal del canino y la mesial del primer premolar.
D2 (Disco 2): Colocado entre la porción distal del segundo premolar y la mesial del primer molar.
D3 (Disco 3): Colocado entre la porción distal del primer molar y la mesial del segundo molar.

Figura 3. Imagen clínica de la férula porta-discos



3.2.2. Intervenciones sobre la formación del biofilm

Los 3 objetivos planteados en este estudio, obligaron a establecer 3 estrategias de intervención diferentes. Para facilitar el seguimiento de cada fase experimental, todos los participantes se sometieron simultáneamente al mismo tipo de intervención durante 4 días, con un período de lavado entre intervenciones de 21 días.

Para cumplimentar el primer objetivo, cada voluntario realizó un enjuague con 10 mL de CHX al 0,2% en solución acuosa durante 30 segundos (Oraldine Perio, Johnson & Johnson, Madrid, España), cada 12 horas, durante los 4 días que portaron la férula; el último enjuague se efectuó la noche anterior a la lectura de las muestras (8 horas antes).

Para el segundo objetivo, los participantes aplicaron el mismo protocolo con la única salvedad de que los enjuagues se realizaron cada 8 horas durante los 4 días que se prolongó el experimento.

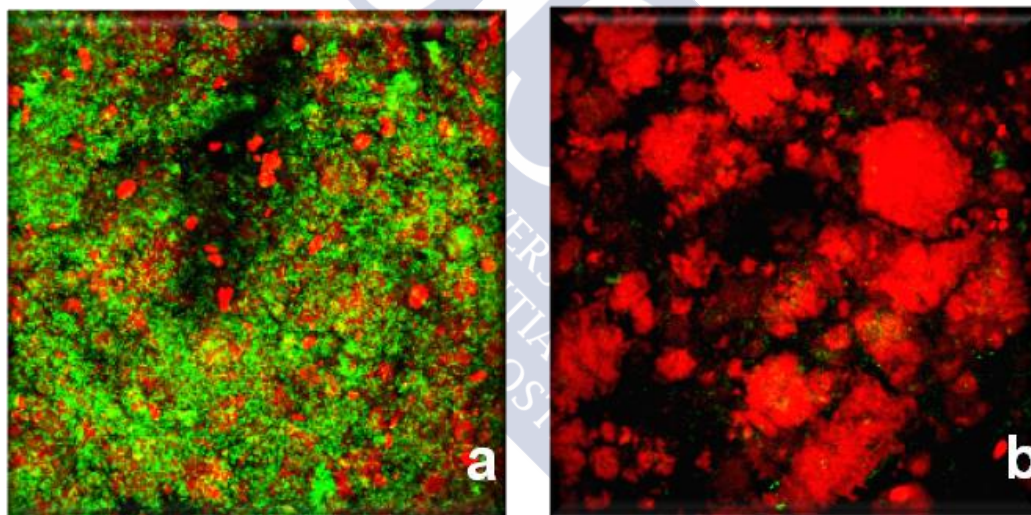
La tercera intervención consistió en que cada voluntario, en lugar de realizar un enjuague con CHX, tomaba un comprimido de AMX/CLV de 500/125mg cada 8 horas, durante los 4 días que portó la férula; es decir, que cada participante recibió un total de 12 comprimidos y la última dosis se administró 8 horas antes de iniciar la lectura de los discos.

3.2.3. Procesamiento y análisis de las muestras

Para poder proceder a su lectura, los discos de cristal se iban retirando uno a uno de la férula, alternando los de la hemiarcada derecha con los de la izquierda y siempre en dirección disto-mesial.

Una vez retirado un disco, era inmediatamente sumergido en 100 μ L de la solución de fluorescencia LIVE/DEAD® BacLight™ (Molecular Probes, Leiden, Holanda) y almacenado en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, un único investigador que desconocía el diseño del estudio, procedía a su observación microscópica empleando un microscopio Láser Confocal Espectral Leica TCS SP2 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania) con un objetivo de inmersión en agua HCX APO L 63x/0,9 (Figura 4).

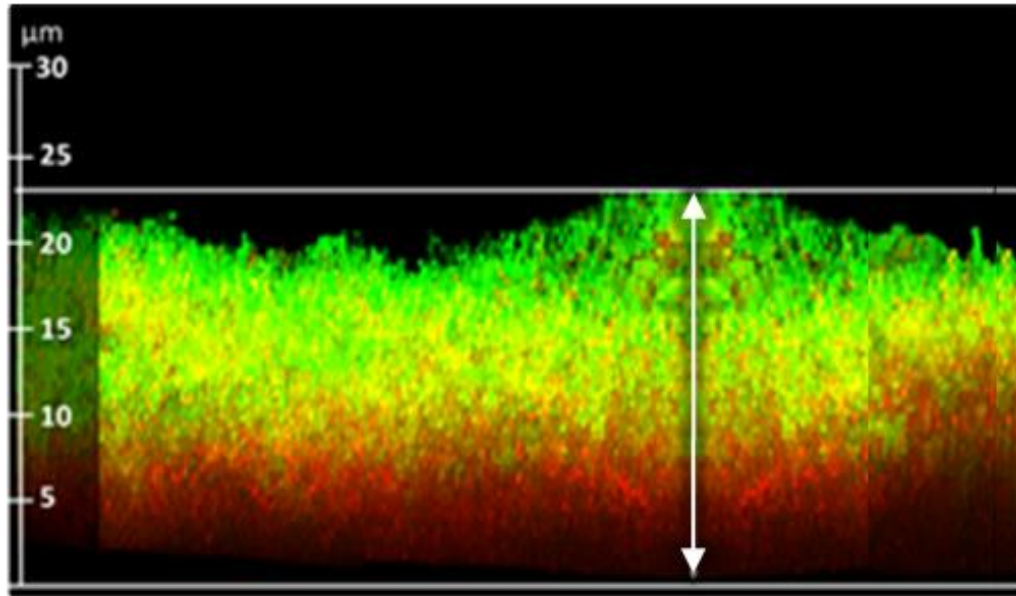
Figura 4. Muestra de biofilm de placa dental. a) Con predominio de membranas intactas (emitiendo fluorescencia verde). b) Con predominio de membranas dañadas (emitiendo fluorescencia roja)



En la parte central de cada disco se evaluaron 4 campos o series x-y-z seleccionados aleatoriamente. La emisión de fluorescencia se determinó en series de imágenes x-y, en las que cada imagen se correspondió con cada una de las posiciones en z (en profundidad). Las unidades ópticas son escaneadas en secciones de 1 μ m desde la superficie del biofilm hasta la base del mismo, determinando así el grosor máximo del campo (Figura 5), definido como la distancia existente entre el sustrato y los picos de los grupos bacterianos más altos, como ya se había hecho en trabajos publicados previamente por otros autores (*Roberts et al, 1999*). Para poder efectuar un análisis comparativo del espesor del biofilm en términos de vitalidad bacteriana, el grosor máximo de cada

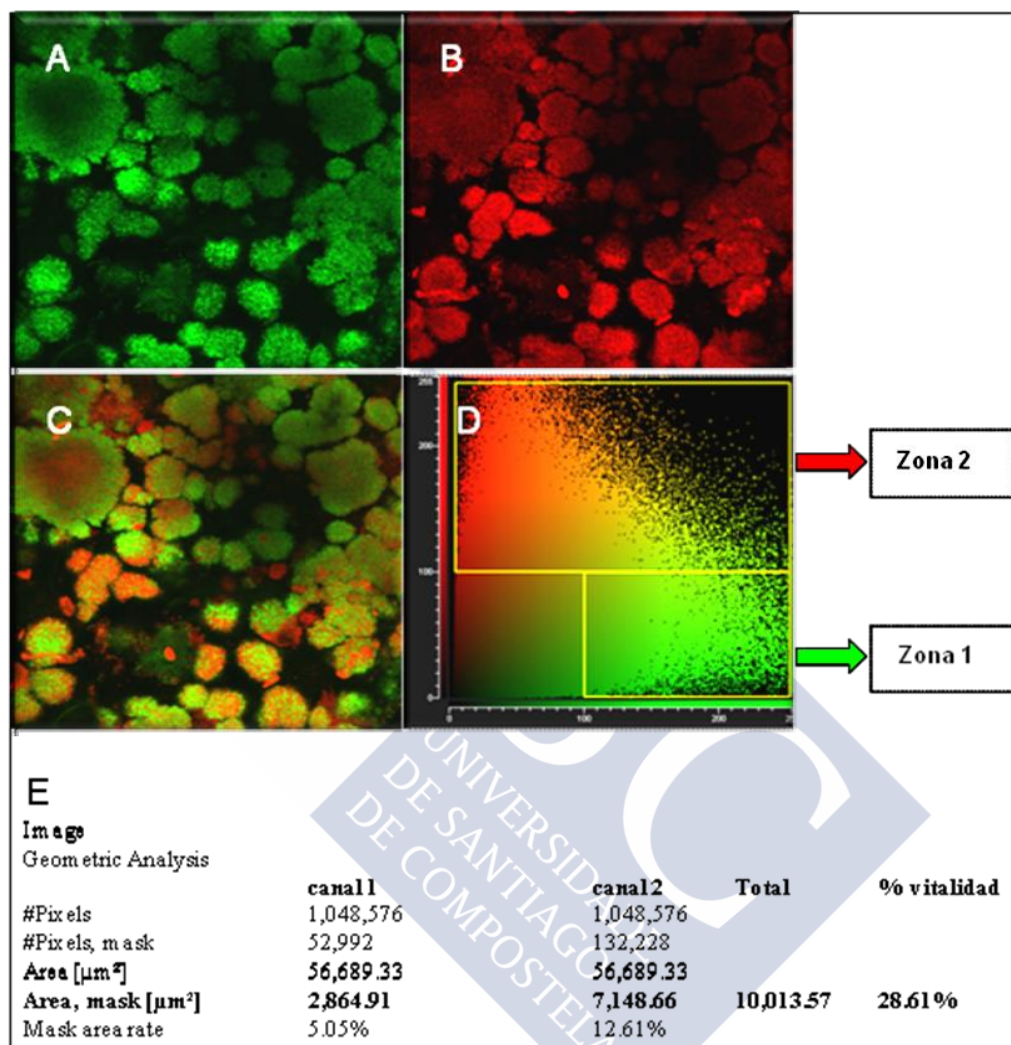
campo se dividió en tres zonas o capas equivalentes: capa 1 o capa superficial, capa 2 o capa intermedia, capa 3 o capa interna.

Figura 5. Determinación del grosor máximo de un biofilm de placa dental (proyección lateral) en secciones de los ejes X-Z apiladas en el eje Y



La cuantificación de la vitalidad bacteriana en series de imágenes x-y se determinó mediante el análisis del citofluorograma (Leica Confocal Software). En este análisis las imágenes de cada fluorocromo se describen como “canales” (SYTO 9 ocupa el “canal verde” y YP el “canal rojo”), obteniéndose valores de área (μm^2) ocupada por cada canal, el área total ocupada por biofilm y el porcentaje correspondiente de vitalidad (Figura 6). Para el cálculo del porcentaje medio de vitalidad bacteriana de cada campo se incluyeron las secciones con un área mínima de biofilm de $250 \mu\text{m}^2$, y posteriormente se determinó el porcentaje medio de vitalidad bacteriana del biofilm de la totalidad de la muestra y de cada una de sus capas.

Figura 6. Cuantificación de la vitalidad bacteriana analizando la emisión de fluorescencia en secciones de los ejes X-Y correspondientes a diferentes posiciones de Z (profundidad)



A) Canal verde (muestra las membranas citoplasmáticas intactas); **B)** Canal rojo (muestra las membranas dañadas); **C)** Superposición de los canales verde y rojo; **D)** Fluorograma y segmentación; **E)** Cuantificación automática de los datos de una sección.

Para cuantificar el porcentaje de superficie del sustrato cubierta por biofilm se utilizó el citofluorograma. Para ello, se superponen todos los planos capturados de cada uno de los campos analizados, y el área que ocupa la suma de todos los acúmulos bacterianos (vital y no-vital) se relativiza con respecto a la superficie total del campo (% de área ocupada).

Aunque la composición y la estructura del biofilm que se forma sobre la superficie de los discos de cristal es presumiblemente muy parecida a la placa dental, al no tratarse de un sustrato de esmalte dentario en adelante emplearemos la denominación “biofilm de placa dental” (B-PD).

Para calcular el tamaño muestral *a priori*, considerando un efecto del tamaño de 0,35, un error alfa de 0,05 y un poder estadístico del 80%, se determinó que el grupo de estudio debía incluir a 15 participantes (se utilizó el programa G*Power 3.1.5).

Los resultados fueron analizados con el programa estadístico SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.), por un experto en bioestadística que desconocía el diseño del estudio. La elección de un test paramétrico o no paramétrico dependió del tipo de distribución de los valores de la variable cuantitativa analizada (grosor del B-PD, porcentaje de vitalidad bacteriana y porcentaje de superficie ocupada del sustrato), que se determinó aplicando el test Kolmogorov-Smirnov. Todas las variables cuantitativas analizadas mostraron una distribución normal. Se aplicó el test de ANOVA (modelo de 1 factor con medidas repetidas) para las comparaciones intra-intervención (diferenciando entre las 3 capas del B-PD), utilizando todas las muestras de B-PD. El test ANOVA (modelo de 3 factores, todos con medidas repetidas) también se aplicó para las comparaciones inter-intervención (diferenciando entre las 3 capas del B-PD), incluyendo todas las muestras de B-PD. Se efectuaron comparaciones por pares (con el ajuste de Bonferroni) para el análisis inter-enjuague (incluyendo la diferenciación entre las 3 capas del B-PD). Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

Para facilitar la interpretación de los resultados, se describirá consecutivamente el efecto de las 3 intervenciones realizadas sobre cada una de las 3 variables de respuesta analizadas grosor del B-PD, vitalidad bacteriana y superficie ocupada del sustrato.



4. RESULTADOS



4.1. GROSOR DEL BIOFILM DE PLACA DENTAL

4.1.1. Grosor del B-PD basal

El grosor medio del B-PD de 4 días de evolución en condiciones basales fue de 20,85 μm (rango= 10,25-30,75 μm) (Tabla 6).

Tabla 6. Grosor basal del biofilm de placa dental (μm)

Mínimo	Percentil 25	Mediana	Media	Percentil 75	Máximo
10,25	18,33	20,17	20,85	24,17	30,75

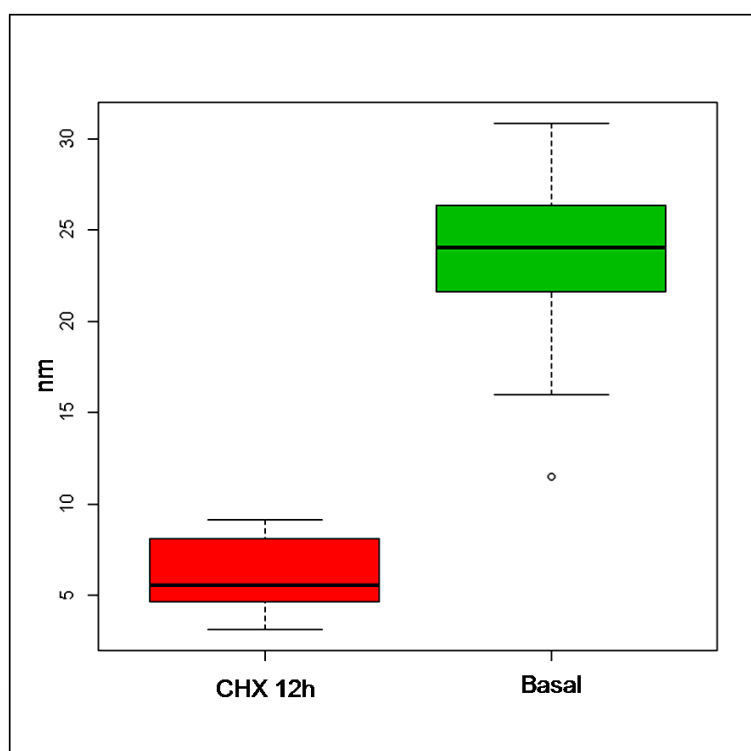
4.1.2. Grosor del B-PD tras administrar clorhexidina 0,20% cada 12 horas durante 4 días

El grosor medio del B-PD después de realizar los enjuagues con CHX 0,20% siguiendo una pauta convencional (cada 12 horas) fue de 6,05 μm (rango= 3,12-9,16 μm) (Tabla 7); este resultado fue significativamente inferior a la determinación basal ($p < 0,001$) (Figura 7).

Tabla 7. Grosor del biofilm de placa dental tras enjuagarse con clorhexidina 0,20% cada 12 horas (μm)

Mínimo	Percentil 25	Mediana	Media	Percentil 75	Máximo
3,12	4,69	6,56	6,05	7,87	9,16

Figura 7. Diagrama de cajas del grosor del biofilm de placa dental en condiciones basales (Basal) y tras administrar clorhexidina 0,20% cada 12 horas durante 4 días (CHX 12h)



CHX 12h= clorhexidina 0,20% cada 12 horas; Basal= condiciones basales

4.1.3. Grosor del B-PD tras administrar clorhexidina 0,20% cada 8 horas durante 4 días

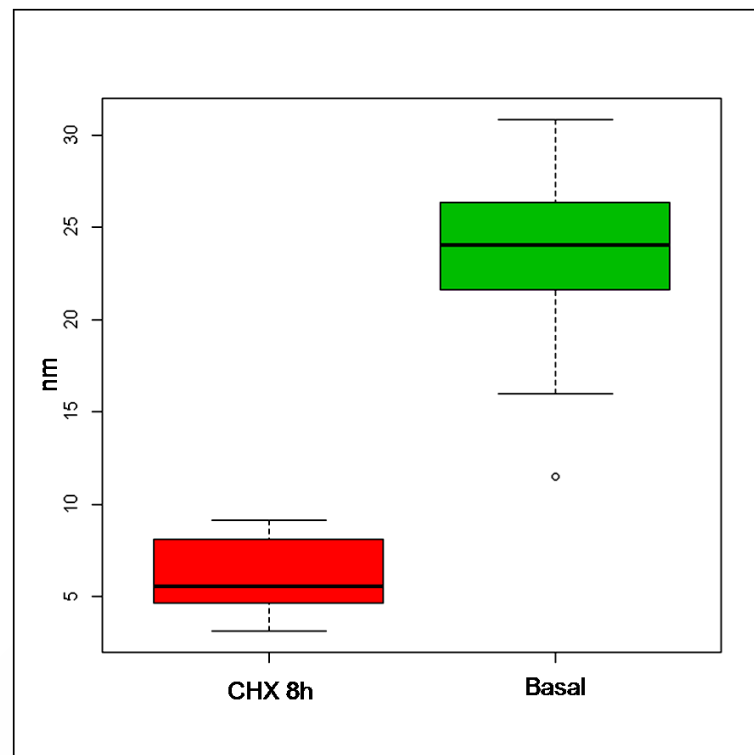
El grosor medio del B-PD realizando enjuagues cada 8 horas fue de 3,74 μm (rango= 1,41-6,79 μm) (Tabla 8).

Tabla 8. Grosor del biofilm de placa dental tras enjuagarse con clorhexidina 0,20% cada 8 horas (μm)

Mínimo	Percentil 25	Mediana	Media	Percentil 75	Máximo
1,41	2,19	3,32	3,74	5,51	6,79

El grosor del B-PD obtenido tras completar el protocolo de enjuagues cada 12 horas resultó significativamente inferior que el grosor en condiciones basales ($p < 0,001$) (Figura 8). Sin embargo, al comparar el grosor del B-PD después de realizar los enjuagues cada 8 horas con el obtenido cuando los enjuagues se efectuaron cada 12 horas, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Figura 8. Diagrama de cajas del grosor del biofilm de placa dental en condiciones basales (Basal) y tras administrar clorhexidina 0,20% cada 8 horas durante 4 días (CHX 8h)



CHX 8h= clorhexidina 0,20% cada 8 horas; Basal= condiciones basales

Un hallazgo casual, fueron los resultados dispares obtenidos en un paciente al efectuar la lectura por la tarde, 8 horas después del último enjuague (a las 8:00 de la mañana), en lugar de la lectura habitual de los discos en horario matutino (último enjuague a las 24:00 horas de la noche anterior). En consecuencia, repetimos el experimento en todos los pacientes de la serie, pero realizando la lectura en horario de tarde.

Cuando la medición se efectuó por la tarde, el grosor medio del B-PD fue de 4,98 μm (rango= 1,50-10,67 μm) (Tabla 9). Este resultado fue significativamente inferior al grosor basal ($p < 0,001$), pero similar al obtenido cuando la lectura se efectuó por la mañana ($p > 0,05$) y tras el regimen de enjuagues cada 12 horas ($p > 0,05$).

Tabla 9. Grosor del biofilm de placa dental tras enjuagarse con clorhexidina 0,20% cada 8 horas, efectuando la lectura de los discos por la tarde (μm)

Mínimo	Percentil 25	Mediana	Media	Percentil 75	Máximo
1,50	3,56	4,33	4,98	6,86	10,67

4.1.4. Grosor del B-PD tras administrar amoxicilina-ácido clavulánico (500/125 mg) cada 8 horas durante 4 días

El valor medio del grosor del B-PD tras completar el régimen antibiótico fue de 20,85 μm (rango= 10,25-30,75 μm) (Tabla 10).

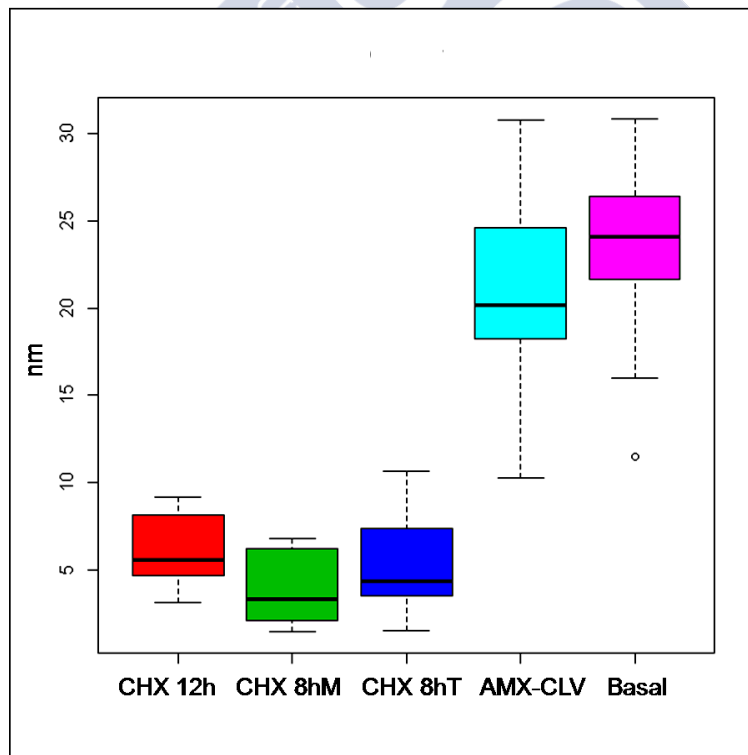
Tabla 10. Grosor del biofilm de placa dental tras administrar amoxicilina-ácido clavulánico (500/125 mg) cada 8 horas durante 4 días (μm)

Mínimo	Percentil 25	Mediana	Media	Percentil 75	Máximo
10,25	18,33	20,17	20,85	24,17	30,75

Este resultado fue similar al obtenido en condiciones basales ($p > 0,05$), pero significativamente mayor al grosor del B-PD alcanzado tras realizar enjuagues con CHX 0,20% con una posología convencional cada 12 horas ($p < 0,001$).

En la figura 9 se detallan gráficamente los grosores del B-PD obtenidos al completar los diferentes regímenes de intervención descritos.

Figura 9. Diagrama de cajas del grosor del biofilm de placa dental tras diferentes intervenciones aplicadas durante 4 días



Basal= condiciones basales; CHX 12h= clorhexidina 0,20% cada 12 horas; CHX 8hM, 8hT= clorhexidina 0,20% cada 8 horas leyendo los discos por la mañana (M) o por la tarde (T); AMX-CLV= amoxicilina-ácido clavulánico (500/125 mg) cada 8 horas

4.2. VITALIDAD BACTERIANA DEL BIOFILM DE PLACA DENTAL

4.2.1. Vitalidad bacteriana del B-PD basal

En condiciones basales, el valor medio de la vitalidad bacteriana en el B-PD fue de 49,13 % (rango= 35,8-67,46 %) (Tabla 11).

Tabla 11. Vitalidad bacteriana basal en un biofilm de placa dental

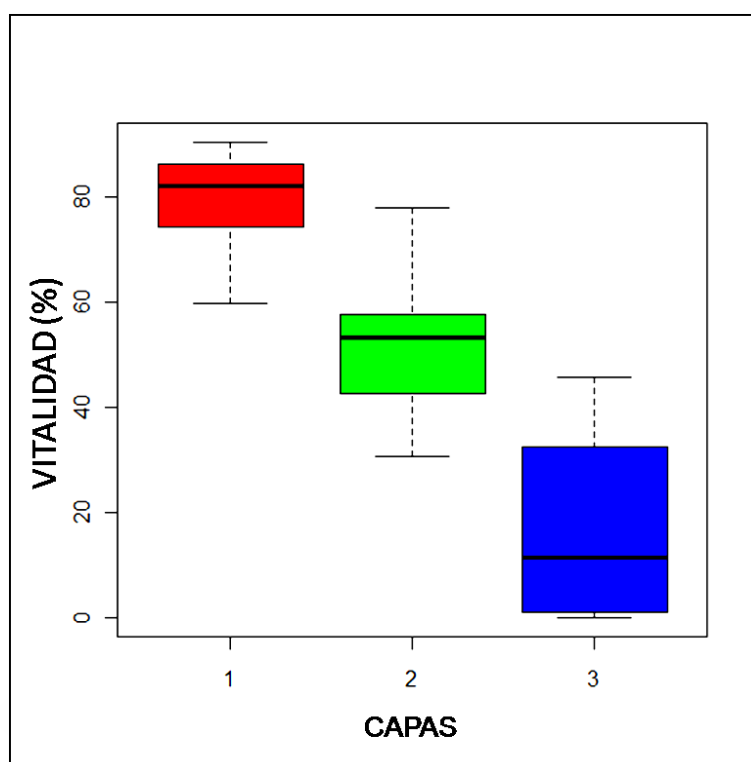
Mínimo	Percentil 25	Mediana	Media	Percentil 75	Máximo
35,08 %	42,58 %	48,03 %	49,13 %	54,98 %	67,46 %

Como ya hemos señalado, el espesor del B-PD se analizó dividiéndolo en tres capas: superficial (capa 1), intermedia (capa 2) y profunda (capa 3). Al comparar los porcentajes de vitalidad de las diferentes capas, observamos diferencias estadísticamente significativas entre la capa 1 y la capa 2 ($p < 0,001$), entre la capa 1 y la capa 3 ($p < 0,001$), y entre la capa 2 y la capa 3 ($p < 0,001$) (Tabla 12 y Fig. 10).

Tabla 12. Vitalidad bacteriana basal (%) a diferentes profundidades en un biofilm de placa dental

	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Media	Percentil 75	Máximo
Capa 1	59,82 %	74,71 %	82,24 %	79,28 %	86,26 %	90,43 %
Capa 2	30,78 %	44,85 %	53,35 %	52,56 %	57,47 %	77,90 %
Capa 3	0,07 %	1,04 %	11,55 %	15,55 %	28,08 %	45,62 %

Figura 10. Diagrama de cajas de la vitalidad bacteriana basal (%) a diferentes profundidades en un biofilm de placa dental



1= capa superficial; 2= capa intermedia; 3= capa profunda

4.2.2. Vitalidad bacteriana del B-PD tras administrar clorhexidina 0,20% cada 12 horas durante 4 días

En comparación con el registro basal, el porcentaje de vitalidad bacteriana del B-PD disminuyó de forma muy significativa tras la realización de enjuagues con CHX 0,20% durante 4 días cada 12 h ($p < 0,001$). El valor medio de vitalidad bacteriana obtenido fue de 13,65 % (rango= 0-51,44%) (Tabla 13).

Tabla 13. Vitalidad bacteriana en un biofilm de placa dental, tras administrar clorhexidina 0,20% cada 12 horas durante 4 días

Mínima	Percentil 25	Mediana	Media	Percentil 75	Máxima
0 %	0 %	0 %	13,65 %	25,28 %	51,44 %

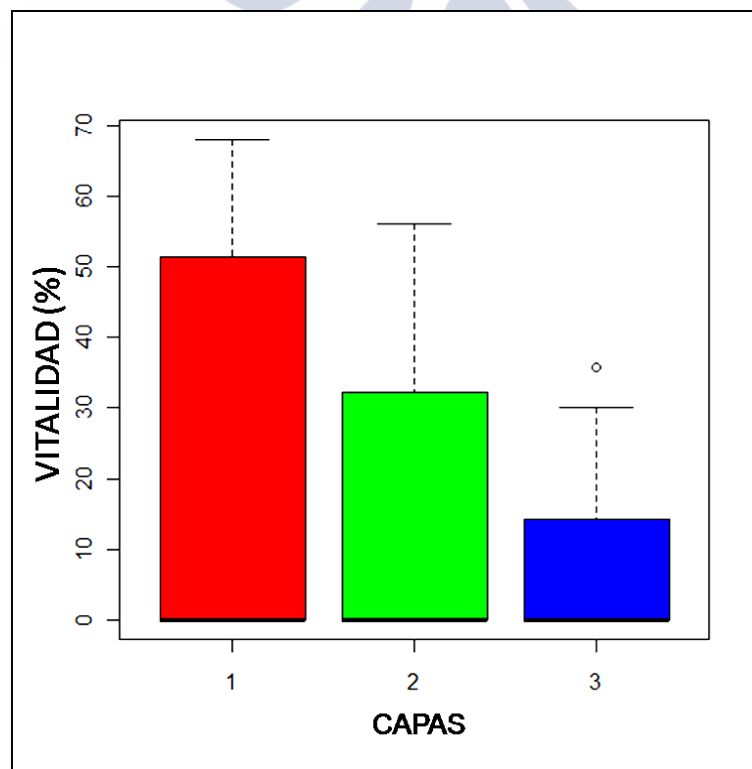
También se estudió la vitalidad en las diferentes capas del espesor del B-PD, observando que en las más superficiales había una mayor cantidad de

bacterias vivas con respecto a las capas profundas, aunque esta diferencia sólo resultó estadísticamente significativa al comparar las capas 1 y 3 ($p < 0,05$) (Tabla 14 y Fig. 11).

Tabla 14. Vitalidad bacteriana a diferentes profundidades en un biofilm de placa dental, tras administrar clorhexidina 0,20% cada 12 horas durante 4 días

	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Media	Percentil75	Máximo
Capa 1	0 %	0 %	0 %	18,26 %	39,40 %	68,07 %
Capa 2	0 %	0 %	0 %	14,39 %	24,99 %	56,22 %
Capa 3	0 %	0 %	0 %	8,31 %	11,46 %	35,68 %

Figura 11. Diagrama de cajas de la vitalidad bacteriana (%) a diferentes profundidades en un biofilm de placa dental, tras administrar clorhexidina 0,20% cada 12 horas durante 4 días



1= capa superficial; 2= capa intermedia; 3= capa profunda

4.2.3. Vitalidad bacteriana del B-PD tras administrar clorhexidina 0,20% cada 8 horas durante 4 días

El valor medio de la vitalidad bacteriana realizando enjuagues con CHX cada 8 horas fue de 1,98% (rango= 0-10,01%) (Tabla 15). Se observó una reducción estadísticamente significativa de la vitalidad con respecto a la registrada en el B-PD en condiciones basales ($p < 0,001$), pero no con respecto a la obtenida después de aplicar el régimen de enjuagues cada 12 horas ($p > 0,05$).

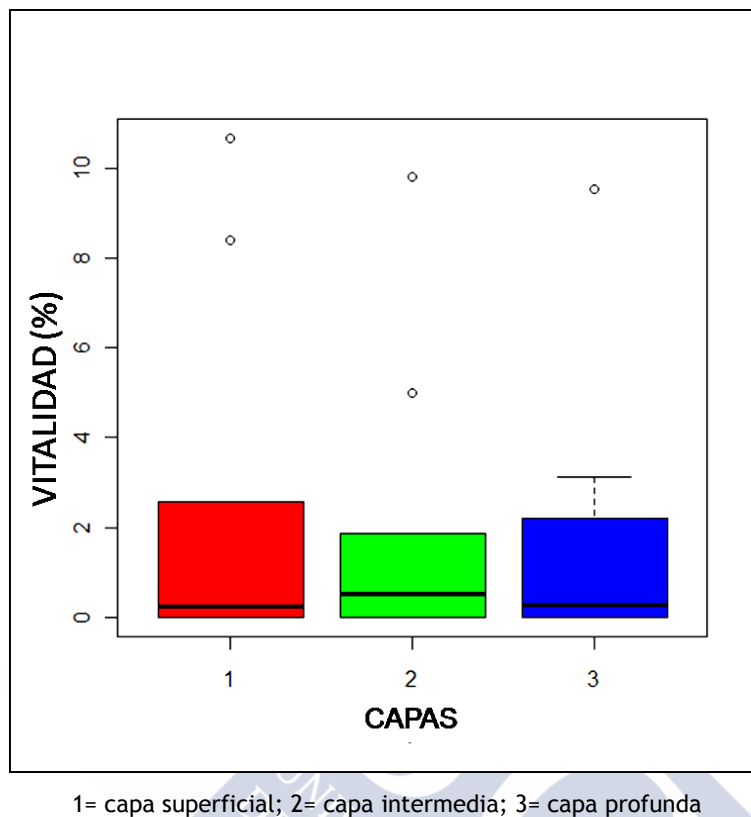
Tabla 15. Vitalidad bacteriana en un biofilm de placa dental, tras administrar clorhexidina 0,20% cada 8 horas durante 4 días

Mínimo	Percentil 25	Mediana	Media	Percentil 75	Máximo
0 %	0 %	0,33 %	1,98 %	1,89 %	10,01 %

Al analizar la vitalidad bacteriana por capas después de 4 días de la aplicación de CHX 0,20% cada 8 horas, no encontramos diferencias significativas entre capas, aunque sí una cierta tendencia a la significación entre las capas 1 y 3 ($p = 0,054$) (Figura 12).

Al repetir el experimento pero efectuando la lectura de los discos por la tarde (último enjuague a las 8:00 de la mañana), el valor medio de la vitalidad bacteriana fue de 5,5% (rango= 1-10%). Al efectuar el análisis de los resultados por capas, se confirmó que existían diferencias estadísticamente significativas entre la capa 1 y la capa 3 ($p < 0,05$); sin embargo, en términos absolutos este hallazgo parece poco relevante, ya que el porcentaje medio de vitalidad en ambas capas fue de 14,81% (rango= 0-43,71%) y 12,56% (rango= 0-33,14%), respectivamente.

Figura 12. Diagrama de cajas de la vitalidad bacteriana (%) a diferentes profundidades en un biofilm de placa dental, tras administrar clorhexidina 0,20% cada 8 horas durante 4 días



4.2.4. Vitalidad bacteriana del B-PD tras administrar amoxicilina/ácido clavulánico 500/125 mg cada 8 horas durante 4 días

El valor medio de la vitalidad bacteriana en el B-PD tras recibir una pauta de antibiótico con AMX/CLV cada 8 horas durante 4 días, fue de 56,64% (rango= 42,70-69,77%) (Tabla 16).

Tabla 16. Vitalidad bacteriana en un biofilm de placa dental, tras administrar amoxicilina/ácido clavulánico 500/125 mg cada 8 horas durante 4 días

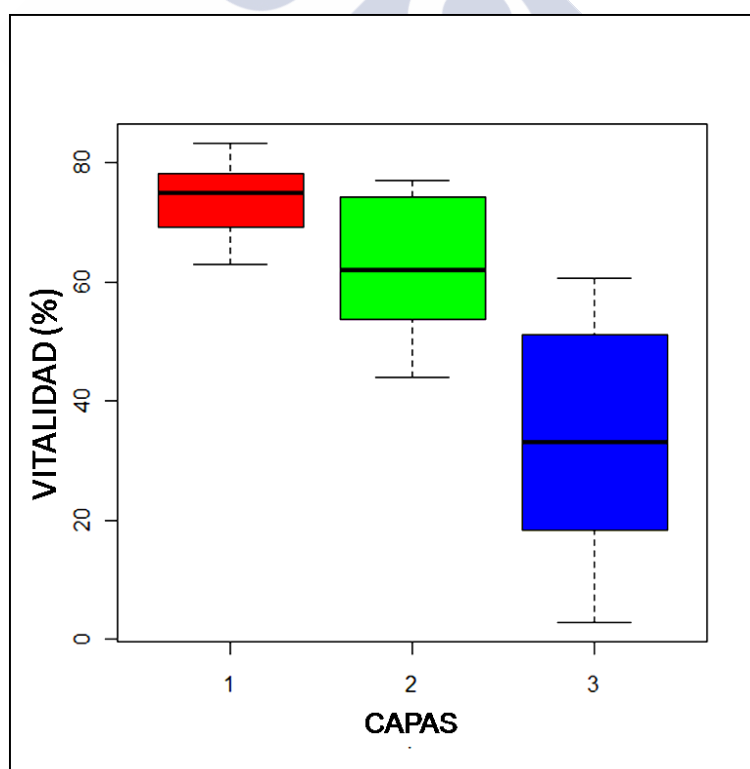
Mínimo	Percentil 25	Mediana	Media	Percentil 75	Máximo
42,70 %	47,30 %	56,00 %	56,64 %	66,88 %	69,77 %

El análisis de la vitalidad por capas demostró diferencias estadísticamente significativas entre las capas 1 y 2 ($p < 0,05$), entre las capas 1 y 3 ($p < 0,001$) y entre las capas 2 y 3 ($p < 0,001$) (Tabla 17 y Figura 13).

Tabla 17. Vitalidad bacteriana a diferentes profundidades en un biofilm de placa dental, tras administrar amoxicilina/ácido clavulánico 500/125 mg cada 8 horas durante 4 días

	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Media	Percentil75	Máximo
Capa 1	63,03 %	69,60 %	74,94 %	74,39 %	78,19 %	83,30 %
Capa 2	43,91 %	55,20 %	62,16 %	63,18 %	73,42 %	77,11 %
Capa 3	2,88 %	18,99 %	33,14 %	32,29 %	48,94 %	60,60 %

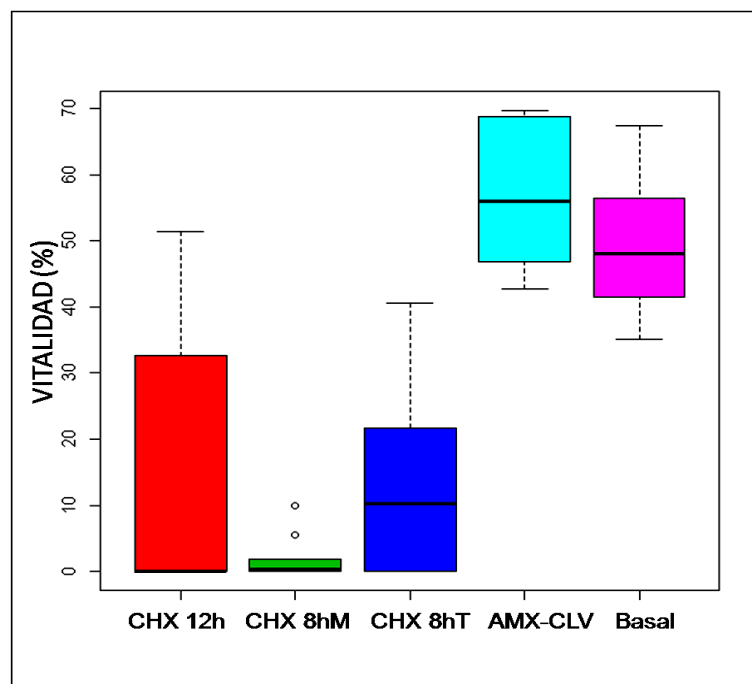
Figura 13. Diagrama de cajas de la vitalidad bacteriana (%) a diferentes profundidades en un biofilm de placa dental, tras administrar amoxicilina/ácido clavulánico 500/125 mg cada 8 horas durante 4



1= capa superficial; 2= capa intermedia; 3= capa profunda

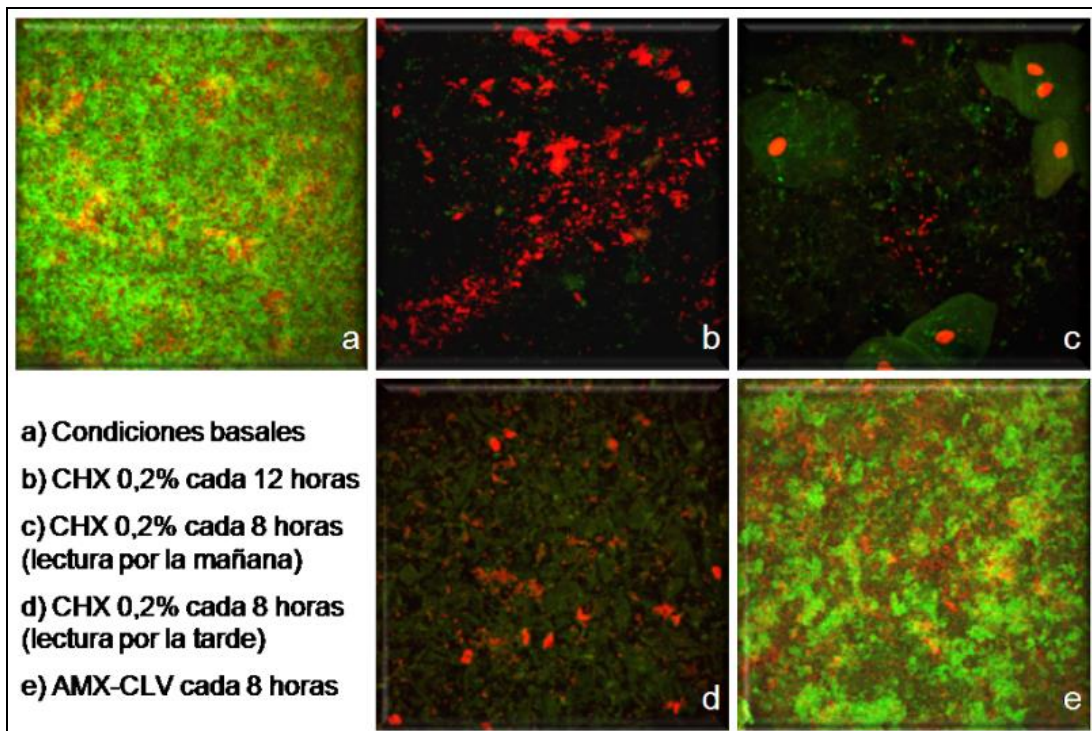
La vitalidad bacteriana detectada en el B-PD tras la administración pautada de AMX/CLV resultó similar a la observada en condiciones basales ($p > 0,05$). Sin embargo, fue significativamente mayor que la registrada tras realizar durante 4 días enjuagues con CHX 0,2%, tanto con la posología de 12 horas ($p < 0,001$) como con la de 8 horas ($p < 0,001$) (Figuras 14 y 15).

Figura 14. Diagrama de cajas de la vitalidad bacteriana (%) en un biofilm de placa dental tras diferentes intervenciones aplicadas durante 4 días



Basal= condiciones basales; CHX 12h= clorhexidina 0,20% cada 12 horas; CHX 8hM, 8hT= clorhexidina 0,20% cada 8 horas leyendo los discos por la mañana (M) o por la tarde (T); AMX-CLV= amoxicilina-ácido clavulánico (500/125 mg) cada 8 horas

Figura 15. Imágenes de microscopía confocal de la vitalidad bacteriana en un biofilm de placa dental, tras diferentes intervenciones aplicadas durante 4 días



Condiciones basales= tras 4 días de crecimiento; CHX= clorhexidina en colutorio;
AMX-CLV= amoxicilina-ácido clavulánico por vía oral (500/125 mg)

4.3. ÁREA OCUPADA POR EL BIOFILM DE PLACA DENTAL

4.3.1. Área ocupada por el B-PD basal

En condiciones basales, el porcentaje medio del área ocupada por el B-PD fue del 78,64% (rango= 35,33-93,64%) (Tabla 18).

Tabla 18. Porcentaje del área ocupada por el biofilm de placa dental en condiciones basales

Mínimo	Percentil 25	Mediana	Media	Percentil 75	Máximo
35,33	75,23	83,92	78,64	87,17	93,64

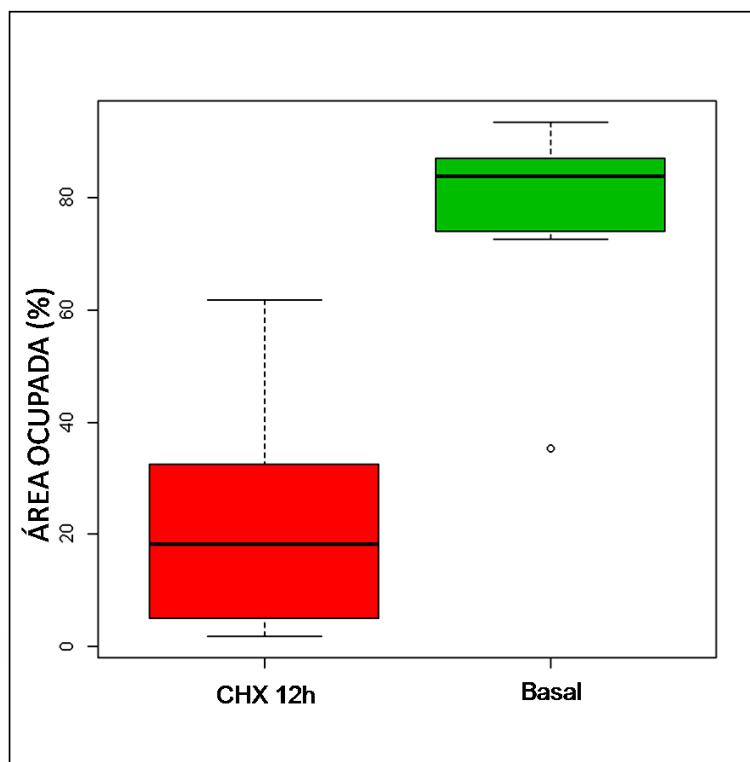
4.3.2. Área ocupada por el B-PD tras administrar clorhexidina 0,20% cada 12 horas durante 4 días

El porcentaje medio de ocupación del B-PD después de realizar los enjuagues con CHX 0,20% siguiendo una pauta convencional (cada 12 horas) fue de 21,14% (rango= 1,70-61,85%) (Tabla 19); este resultado fue significativamente inferior a la determinación basal ($p < 0,001$) (Figura 16).

Tabla 19. Porcentaje del área ocupada por el biofilm de placa dental tras enjuagarse con clorhexidina 0,20% cada 12 horas

Mínimo	Percentil 25	Mediana	Media	Percentil 75	Máximo
1,70	5,84	18,14	21,14	32,47	61,85

Figura 16. Diagrama de cajas del área ocupada por el biofilm de placa dental en condiciones basales (Basal) y tras administrar clorhexidina 0,20% cada 12 horas durante 4 días (CHX 12h)



CHX 12h= clorhexidina 0,20% cada 12 horas; Basal= condiciones basales

4.3.3. Área ocupada por el B-PD tras administrar clorhexidina 0,20% cada 8 horas durante 4 días

El porcentaje medio del área ocupada por el B-PD al completar los 4 días de enjuagues con CHX cada 8 horas fue de 10,83% (rango= 0,13-41,69%) (Tabla 20). Se observó una reducción estadísticamente significativa con respecto al área ocupada por el B-PD en condiciones basales ($p < 0,001$) (Figura 17), pero no con respecto a la obtenida después de aplicar el régimen de enjuagues cada 12 horas ($p > 0,05$).

Tabla 20. Porcentaje del área ocupada por el biofilm de placa dental tras enjuagarse con clorhexidina 0,20% cada 8 horas

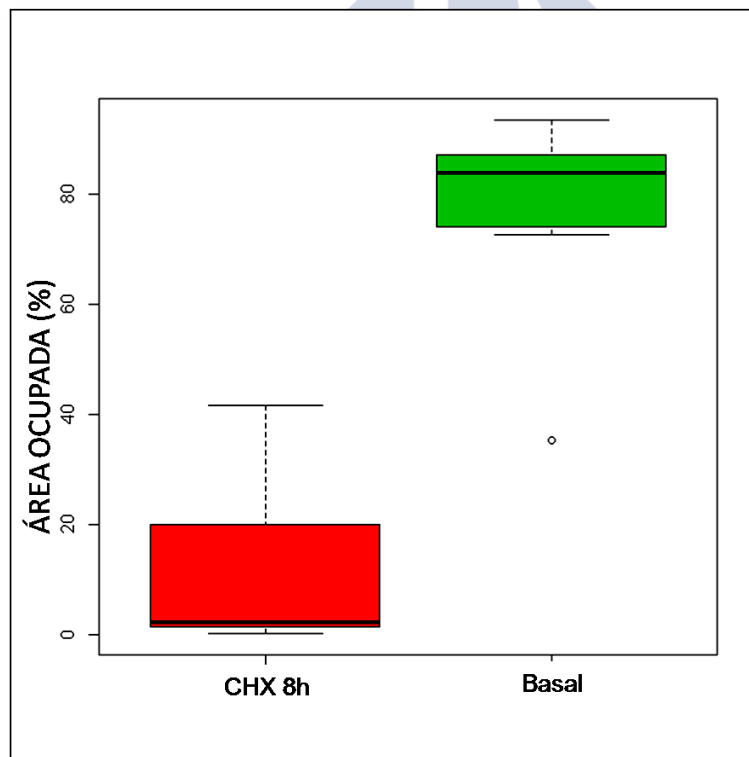
Mínimo	Percentil 25	Mediana	Media	Percentil 75	Máximo
0,13	1,37	2,14	10,83	15,90	41,69

Cuando la lectura de los discos se realizó por la tarde, 8 horas después del último enjuague (efectuado a las 8:00 de la mañana), el porcentaje medio de área ocupada fue del 13,11% (rango= 0,13-38,5%) (Tabla 21). Este porcentaje fue similar al obtenido en las lecturas matutinas tanto en el régimen de enjuagues cada 8 horas como cada 12 horas ($p > 0,05$ en ambos casos), y significativamente menor que el alcanzado en condiciones basales ($p < 0,001$)

Tabla 21. Porcentaje del área ocupada por el biofilm de placa dental tras enjuagarse con clorhexidina 0,20% cada 8 horas, efectuando la lectura de los discos por la tarde

Mínimo	Percentil 25	Mediana	Media	Percentil 75	Máximo
0,13	1,96	8,38	13,11	20,01	38,58

Figura 17. Diagrama de cajas del área ocupada por el biofilm de placa dental en condiciones basales (Basal) y tras administrar clorhexidina 0,20% cada 8 horas durante 4 días (CHX 12h)



CHX 8h= clorhexidina 0,20% cada 8 horas; Basal= condiciones basales

4.3.4. Área ocupada por el B-PD tras administrar amoxicilina-ácido clavulánico (500/125 mg) cada 8 horas durante 4 días

El valor medio del porcentaje del área ocupada por el B-PD tras completar el régimen antibiótico fue de 67,88% (rango= 18,42-90,92%) (Tabla 22).

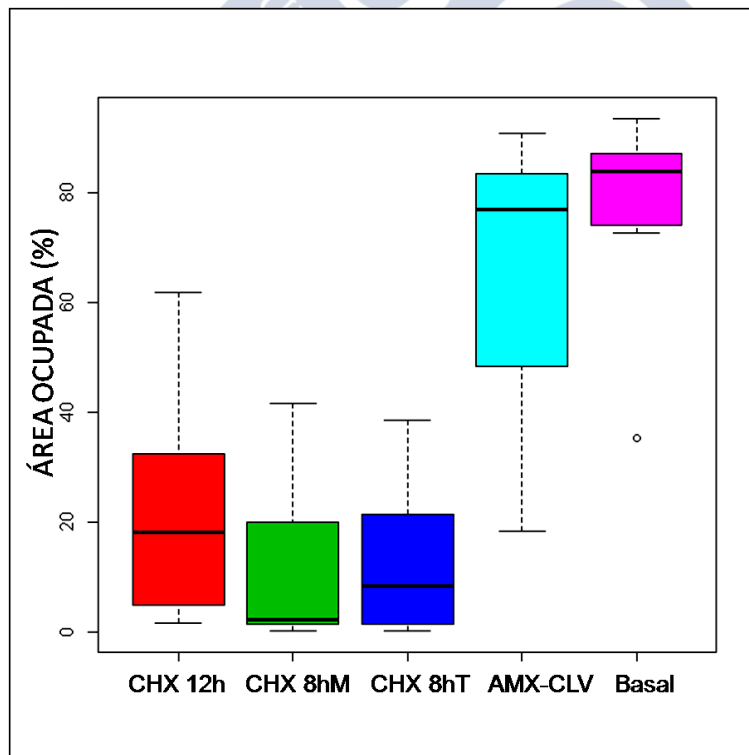
Tabla 22. Porcentaje del área ocupada por el biofilm de placa dental tras administrar amoxicilina-ácido clavulánico (500/125 mg) cada 8 horas durante 4 días

Mínimo	Percentil 25	Mediana	Media	Percentil 75	Máximo
18,42	54,10	77,07	67,88	83,51	90,92

Este resultado fue similar al obtenido en condiciones basales ($p > 0,05$), pero significativamente mayor al alcanzado tras realizar enjuagues con CHX 0,20% bien cada 12 horas ($p < 0,001$) o bien cada 8 horas ($p < 0,001$).

En la figura 18 se detallan gráficamente los porcentajes de la superficie del sustrato ocupada por el B-PD, obtenidos al completar los diferentes regímenes de intervención descritos.

Figura 18. Diagrama de cajas del área ocupada por el biofilm de placa dental tras diferentes intervenciones aplicadas durante 4 días



Basal= condiciones basales; CHX 12h= clorhexidina 0,20% cada 12 horas; CHX 8hM, 8hT= clorhexidina 0,20% cada 8 horas leyendo los discos por la mañana (M) o por la tarde (T); AMX-CLV= amoxicilina-ácido clavulánico (500/125 mg) cada 8 horas



5. DISCUSIÓN



5.1. DISCUSIÓN DE LA METODOLOGÍA

A comienzos de los años 90, Watson et al (Watson 1991; Watson et al, 1992) sugirieron la posible aplicación de la Microscopía de Barrido Láser Confocal (siglas en inglés, CLSM) en la investigación clínica dental *in vivo*, y Netuschil et al (Netuschil et al, 1998), en 1998, fueron los primeros investigadores en utilizar este método no invasivo para analizar el grosor y la distribución de la vitalidad del B-PD humano no alterado. Más tarde, algunos autores diseñaron aparatos orales removibles especiales que incorporaban una serie de discos sobre los que crecía el B-PD (Auschill et al, 2001; Arweiler et al, 2004; Auschill et al, 2005). Este B-PD no alterado era a continuación analizado con CLSM, utilizando soluciones de fluorescencia (Auschill et al, 2001; Arweiler et al, 2004; Auschill et al, 2005).

Actualmente, la comunidad científica considera que este diseño metodológico es la aproximación más adecuada para estudiar *in vivo* la arquitectura y la fisiología del B-PD, la formación del biofilm sobre los materiales dentales y el efecto antibacteriano de los antimicrobianos en esta estructura microbiana (Wood et al, 2000; Arweiler et al, 2004; Hanning y Hanning, 2009).

Sin embargo, la implementación de variables metodológicas como el sustrato de los discos utilizados para recoger el B-PD, el tiempo ideal de formación del biofilm o la técnica de fluorescencia aplicada, pueden condicionar los resultados experimentales y por lo tanto exigen su abordaje en esta discusión.

5.1.1. Aparatos removibles porta-discos para recoger el B-PD

Se ha demostrado que los biofilms orales formados sobre las superficies mucosas son diferentes a aquéllos que asientan sobre los tejidos duros, y que la composición de la placa dental supragingival difiere de la placa subgingival (Palmer et al, 2001). Consecuentemente, estos factores deben tenerse en consideración al diseñar modelos para generar B-PD *in vivo*.

Wood et al (Wood et al, 1999; Wood et al, 2000), Watson et al (Watson et al, 2005) y Robinson et al (Robinson et al, 2006), utilizaron el “Leeds *in situ* device”, un diseño descrito por Robinson et al (Robinson et al, 1997) en 1997, compuesto por un anillo de nylon que contenía un sustrato de esmalte sobre el cual crecía el B-PD. Estos aparatos se adherían a las superficies vestibulares de los primeros o segundos molares superiores por medio de una resina, proporcionando un lugar de estancamiento para la formación del B-PD.

El grupo de investigación dirigido por Palmer (*Palmer et al, 2003; Diaz et al, 2006; Palmer et al, 2006; Chalmers et al, 2007*), diseñó dos muelles mandibulares bilaterales, que abarcaban las superficies vestibulares de los premolares y del primer molar, conteniendo cada uno de ellos varios discos.

Numerosos autores han utilizado diferentes tipos de férulas de acrílico individualizadas para recoger el B-PD (*Auschill et al 2001; Arweiler et al 2004; Auschill et al, 2005; Al-Ahmad et al, 2007; Arweiler et al, 2008*). Aplicando un diseño similar a los de estos trabajos, empleamos unas férulas individualizadas conformadas por dos láminas de vinilo en las que se alojaban los discos que entraban en contacto directo con la saliva a través de unas fenestraciones, evitando distorsiones del B-PD acumulado por la acción de los tejidos blandos adyacentes y durante la colocación o la retirada del dispositivo. Las ventajas de este particular diseño ya se han acreditado en una tesis doctoral previa (*García-Caballero, 2012*), aunque recientemente ha sido objeto de algunas modificaciones que intentan mejorar la estética, minimizar el disconfort y facilitar la higiene oral durante el tiempo que se prolongue la fase experimental de formación del B-PD (*Prada-López et al, 2015a*).

5.1.2. Sustratos para recoger el B-PD

Se han utilizado un gran número de sustratos sólidos de diferentes características en los estudios publicados sobre el B-PD, incluyendo esmalte humano (*Netuschil et al, 1998; Wood et al, 2000; Auschill et al, 2001; Palmer et al, 2003; Chalmers et al, 2007*), esmalte bovino (*Al-Ahmad et al, 2007; Arweiler et al, 2008; Jung et al, 2010*), dentina bovina (*Zaura-Arite et al, 2001; Jung et al, 2010*), hidroxiapatita (*Gu et al, 2005*) y vidrio pulido (*Netuschil et al, 1998; Arweiler et al, 2004; Auschill et al, 2005; Dige et al, 2009*).

Zaura-Arite et al (*Zaura-Arite et al, 2001*) emplearon discos de dentina bovina, con la novedad de que en su superficie practicaron 3 surcos paralelos entre si (cada uno de 200 μm de ancho y aproximadamente 500 μm de profundidad), con el fin de imitar la morfología de la superficie dentaria. Otros autores han descrito la formación del B-PD sobre materiales dentales de restauración, utilizando sustratos tan heterogéneos como amalgama de plata, oro, cerámica, composite, compómero, cemento de vidrio ionómero o polimetilmetacrilato (*Auschil et al, 2002; Konishi et al, 2003; Perez Davidi et al, 2007*).

En estudios preliminares para establecer el diseño metodológico del presente trabajo, comprobamos que no existían diferencias significativas en el grosor ni la vitalidad bacteriana de un B-PD de 2 días, cuando utilizamos discos de vidrio o de hidroxiapatita. Sin embargo, cuando incorporamos discos de vinilo, el grosor del B-PD aumentó significativamente, pero a expensas de una masa

hipocelular difícilmente valorable (García-Caballero, 2012). Además, algunos autores ya habían recomendado el empleo de vidrio para evitar posibles alteraciones ópticas como consecuencia de la consabida autofluorescencia del esmalte (Netuschil *et al*, 1998; Dige *et al*, 2007). Basándonos en esta propuesta y en nuestros resultados preliminares, en la presente investigación utilizamos discos de vidrio para analizar el crecimiento *in situ* de un B-PD.

5.1.3. Período de formación del B-PD

En la mayoría de los estudios publicados sobre B-PD, el tiempo durante el cual el aparato colector permanece en la cavidad oral está comprendido entre 4 horas (Palmer *et al*, 2003; Konisi *et al*, 2003; Diaz *et al*, 2006; Palmer *et al*, 2006) y 7 días (Watson *et al*, 2005; Robinson *et al*, 2006; Al-Ahmad *et al*, 2007), dependiendo del tipo de B-PD a analizar.

Por ejemplo, Prates *et al* (Prates *et al*, 2007) en un estudio donde investigaron el efecto bactericida de una terapia fotodinámica, consideraron necesario un biofilm de al menos 24 horas. Auschil *et al* (Auschil *et al*, 2004) emplearon un biofilm de 48 horas para determinar si su grosor se alteraba por la localización del aparato removible dentro de la cavidad oral (región vestibular maxilar *vs* región vestibular mandibular) o por la posición del disco (distal *vs* mesial; derecha *vs* izquierda). Arweiler *et al* (Arweiler *et al*, 2004) también recurrieron a biofilms de 48 horas para determinar el impacto de la localización del disco en la cavidad oral sobre la vitalidad bacteriana. Por otra parte, Wood *et al* (Wood *et al*, 2000) observaron que la distribución de un B-PD de 4 días era heterogénea, con mayor grosor en la unión entre el sustrato y el elemento portadiscos, y menor en la zona central. En 2008, Arweiler *et al* (Arweiler *et al*, 2008) utilizan un modelo *in vivo* de B-PD de 5 días para estudiar la eficacia de un antiséptico y, en contraste a lo esperado, su grosor resultó similar al obtenido en estudios *in vitro* en un B-PD con menos tiempo de formación (Thurnheer *et al*, 2003).

Sánchez *et al* (Sánchez *et al*, 2011) realizaron un estudio *in vitro* para determinar el patrón de crecimiento de un B-PD, empleando para ello bacterias propias de la microbiota subgingival; a las 12 horas, los primeros colonizadores ya se adhirieron a la superficie de los discos de hidroxiapatita; los colonizadores intermedios como el *Fusobacterium nucleatum* no fueron detectados hasta transcurridas 24 horas de incubación y los colonizadores tardíos no aparecieron antes de las 48 horas. Los autores concluyeron que el biofilm alcanzó una fase de estabilidad a las 72-96 horas y que la vitalidad bacteriana era mayor en la parte central de los discos que en la periferia.

Basándonos en estos hallazgos y en los de otros investigadores que

previamente ya habían sugerido que se necesita un mínimo de 4 días para que se forme un biofilm maduro (*Wood et al, 2000*), en el presente estudio decidimos que los pacientes llevaran el aparato removible porta-discos durante 4 días.

Recientemente, al comparar 2 B-PD con sendos períodos de maduración de 2 y 4 días, se ha demostrado que el grosor permanece prácticamente constante, pero que la vitalidad decrece con el tiempo mientras que el área ocupada por el B-PD aumenta progresivamente (*Prada-López et al, 2015b*); estas variaciones del B-PD inherentes al tiempo de maduración, corroborarían nuestra propuesta de utilizar un B-PD de 4 días.

5.1.4. Técnicas de fluorescencia

Desde que Netuschil (*Netuschil, 1983*) utilizó por primera vez las técnicas de fluorescencia para investigar el B-PD en 1983, muchos autores han empleado una gran variedad de fluorocromos, incluyendo naranja de acridina (*Singh et al, 2003*), fluoresceína (*Wood et al, 2000*), DAPI (*Jung et al, 2010*), diacetato de fluoresceína con bromuro de etidio (*Netuschil et al, 1998; Auschill et al, 2001; Zaura-Arite 2001; Auschill et al, 2005; Arweiler et al, 2008*), y SYTO 9 con yoduro de propidio (PI) (*van der Mei, 2006*). Tanto la fluoresceína con bromuro de etidio como el SYTO 9 con PI, ofrecen la posibilidad de teñir de forma selectiva las bacterias vivas y las muertas; en consecuencia, estos fluorocromos han sido los más utilizados para analizar la vitalidad bacteriana en la mayoría de los estudios *in vivo* sobre B-PD (*Netuschil et al, 1998; Auschill et al, 2001; Zaura-Arite et al, 2001; Auschill et al, 2005; van der Mei et al, 2006; Arweiler et al, 2008; García-Caballero et al, 2013*).

En el presente estudio hemos empleado la tinción dual compuesta por SYTO 9 y PI, que permite que las bacterias que tienen sus membranas citoplasmáticas intactas que emiten fluorescencia verde se diferencien de las bacterias que presentan las membranas dañadas que emiten fluorescencia roja (*Tomás et al, 2009; Tomás et al, 2010*). Por ello, esta técnica se considera particularmente útil en el análisis de la distribución espacial de la vitalidad bacteriana dentro del biofilm y de la actividad antimicrobiana de determinados antisépticos, como la CHX (*Hope y Wilson, 2004; van der Mei et al, 2006; Filoche et al, 2007; García-Caballero et al, 2013; Quintás et al 2015a; Quintás et al, 2015b*). Sus detractores argumentan que la vitalidad puede cuantificarse en varios estadios (viable y cultivable, viable pero no-cultivable, latente, no viable y pre-lítico, y bacteria muerta no-vital), y que la diferenciación entre ellos no puede establecerse en base a esta técnica (*Decker, 2001*).

Otro factor metodológico a tener en cuenta en relación con la fluorescencia es la penetración de los agentes fluorescentes. Paramonova et al (*Paramonova et*

al, 2007) demostraron que una penetración pobre de los colorantes fluorescentes en los biofilms con un grosor mayor a 120 μm , conllevaba una infraestimación significativa de su grosor cuando éste se evaluaba mediante microscopía láser confocal. Un problema adicional relacionado con los biofilms muy gruesos, es el riesgo de subestimar el número de bacterias debido a la evanescencia progresiva del fluorocromo cuando se analizan varias series de campos (*Dige et al, 2007; Paramonova et al, 2007*). Otras desventajas que pueden asociarse a la fluorescencia incluyen: la existencia de un porcentaje de personas (un 8-12% de hombres y casi un 1% de mujeres) que no pueden distinguir los colores verde y rojo, de forma que no pueden extraer información significativa de las imágenes (*Hope et al, 2002*); la influencia del tipo de bacteria (ej. *Actinomyces spp.* ofrece una distribución irregular de las señales fluorescentes, posiblemente debido a una permeabilidad limitada de las paredes bacterianas) y de su estado fisiológico (fase de crecimiento exponencial vs fase estacionaria) respecto a las propiedades de tinción (*Dige et al, 2009; Berney et al, 2007*); algunos fluorocromos revelaron una unión inespecífica significativa a la matriz y una gran fluorescencia de fondo (*Biggerstaff et al, 2006*); o la detección de colores intermedios de difícil interpretación (*Berney et al, 2007*).

5.1.5. Microscopía confocal de barrido por láser

Se han utilizado diferentes técnicas de microscopía para visualizar la microestructura de los biofilms orales *in vivo*, incluyendo la microscopía óptica, la microscopía electrónica de transmisión (siglas en inglés, TEM) y la microscopía electrónica de barrido (siglas en inglés, SEM) (*Listgarten et al, 1975; Listgarten, 1976; Hanning, 1999; Hanning et al, 2007; Tomás et al, 2010*). Aplicando estas técnicas, puede resultar difícil obtener imágenes en áreas profundas de los especímenes y además las muestras requieren un procesamiento que incluye deshidratación, fijación e inclusión, lo que podría ocasionar la retracción y la pérdida de la matriz del biofilm, y afectar hasta al 73-98% de su biomasa (*Handley et al, 1993*). Además, con la TEM es frecuente que se detecten artefactos en las preparaciones (*Wood et al, 2000*).

La irrupción de la microscopía confocal de barrido por láser (siglas en inglés, CLSM), a pesar de tener peor resolución que la TEM (*Dige et al, 2007*), ha eliminado o reducido considerablemente estos problemas. Con la CLSM, los biofilms pueden estudiarse en su estado natural (habitualmente utilizando un objetivo de inmersión en agua de 63x), sin necesidad de deshidratar, fijar, o teñir (*Arweiler et al, 2004; Auschill et al, 2005; Arweiler et al, 2008*). Además, las propiedades de seccionamiento óptico de la CLSM permiten analizar sin desenfoque biofilms de gran grosor, efectuando secciones muy finas en el plano horizontal a intervalos de 0,5-2 μm desde la superficie del biofilm hasta su base

(Konishi et al, 2003; Al-Ahmad et al, 2007; Dige et al, 2007; Arweiler et al, 2008; Dige et al, 2009).

Las primeras experiencias con el CLSM se publicaron hace casi 2 décadas, cuando Robinson et al (Robinson et al, 1997) evaluaron un B-PD de 7 días utilizando esta técnica de microscopía sin emplear soluciones de fluorescencia. Los datos ópticos obtenidos se grabaron como series numeradas del 1 al 20 según el grado de reflectancia observada, con una gama de grises asignados arbitrariamente. Posteriormente, en todos los estudios publicados sobre análisis *in vivo* del B-PD inalterado, los autores emplearon la CLSM con colorantes fluorescentes para hacer visibles los elementos formes (Konishi et al, 2003; Al-Ahmad et al, 2007; Dige et al, 2007; Arweiler et al, 2008; Dige et al, 2009). El valor de excitación y el rango de emisión de las imágenes fluorescentes se miden a diferentes longitudes de onda, dependiendo del fluorocromo utilizado; por ejemplo, los valores de excitación y el rango de emisión de las longitudes de onda para el SYTO 9y el PI son 488 nm (492–550 nm) y 561 nm (588–655 nm), respectivamente (Tomás et al, 2009). La emisión de fluorescencia se mide en series de imágenes X-Y, en donde cada imagen se corresponde con una única posición en Z (profundidad) (Konishi et al, 2003; Al-Ahmad et al, 2007; Dige et al, 2007; Arweiler et al, 2008; Dige et al, 2009).

El grosor del B-PD se utiliza habitualmente como una estimación cuantitativa de su biomasa (Wood et al, 2000; Al-Ahmad et al, 2007; Auschill et al, 2005; Dige et al, 2009). Se ha definido como la distancia existente entre el sustrato y los picos más altos de los acúmulos celulares (Roberts et al, 1999). Sin embargo, algunos autores han señalado que la superficie del sustrato nunca es totalmente horizontal con respecto al porta-muestras del microscopio y que el número de secciones ópticas por espécimen no se corresponde exactamente con el grosor del B-PD (Palmer et al, 2003; Dige et al, 2007; Dige et al, 2009).

La cuantificación bacteriana se puede realizar mediante conteo manual, aunque requiere imágenes de gran aumento que permitan la diferenciación de células individuales. Además, para obtener estimaciones representativas, es necesario grabar y contar un gran número de imágenes consecutivas, para lo que se necesita un tiempo considerable (Dige et al, 2009). También se ha observado que el conteo de células en agregados es complicado, ya que algunas no pueden separarse fácilmente durante la segmentación de imágenes (Hanning et al, 2007; Dige et al, 2009). Probablemente por estos motivos la mayoría de los autores han utilizado herramientas de análisis de imagen automáticas que han sido desarrolladas para la cuantificación de las señales de fluorescencia (Netuschil et al, 1998; Wood et al, 2000; Arweiler et al, 2004; Auschill et al, 2005; Diaz et al, 2006; Al-Ahmad et al, 2007; Arweiler et al, 2008; Jung et al, 2010).

Dige et al (*Dige et al, 2009*), señalaron que la generación de datos cuantitativos a partir de imágenes basadas en señales de fluorescencia es un proceso complejo, por lo que algunos investigadores realizaron análisis cuantitativos basados en las relaciones del área ocupada por el B-PD con respecto al área total del sustrato (principalmente en estudios sobre la vitalidad del biofilm) (*Netuschil et al, 1998; Wood et al, 2000; Zaura-Arite et al, 2001; Arweiler et al, 2004; Auschill et al, 2005; Arweiler et al, 2008*); otros, cuantificaron la biomasa de diferentes dianas (sondas) en el B-PD principalmente en estudios sobre la topografía del biofilm, atribuyendo arbitrariamente el 100% al volumen de fluorescencia correspondiente a EUB338 y calculando proporcionalmente el porcentaje de otras dianas. (*Diaz et al, 2006; Al-Ahmad et al, 2007; Jung et al, 2010*).

La combinación FISH/CLSM y los métodos estereológicos, también representan una herramienta atractiva para la cuantificación *in vivo* de las poblaciones bacterianas en los B-PD (*Dige et al, 2009*). Esta técnica proporciona una determinación objetiva y fiable de la contribución numérica de determinadas especies en comunidades bacterianas mixtas. En gran medida, los métodos estereológicos evitan los problemas inherentes a las variaciones en la intensidad del fluoróforo, que pueden constituir un posible sesgo en el análisis automático de la imagen. Sin embargo, esta técnica también tiene desventajas, ya que requiere de un mayor tiempo de ejecución que el análisis de imagen digital automático y de un conocimiento previo de la morfología bacteriana (*Dige et al, 2009*).

Independientemente de la estrategia de cuantificación, el denso empaquetamiento de las bacterias en los B-PD en ocasiones dificulta el análisis debido a la interferencia producida por las señales de fluorescencia de los planos adyacentes desenfocados (*Dige et al, 2007*). También se han descrito otros problemas como: la evanescencia del fluoróforo tras la realización de las secciones ópticas; la variabilidad de las intensidades de fluorescencia dependiendo de los colorantes utilizados para marcar las sondas y las absorciones celulares específicas de las tinciones de fluorescencia; y la heterogeneidad de los umbrales de detección (*Dige et al, 2009*). Por consiguiente, Sekar et al (*Sekar et al, 2002*) recomendaron que la CLSM del área/volumen del biofilm debería incluir estándares de tamaño como microesferas durante la adquisición de la imagen, para minimizar el error inherente a las medidas cuantitativas.

Otra desventaja potencial de la CLSM, es que el empleo de la microscopía como base de la técnica hace que la selección de regiones de la placa dental para su análisis sea observador-dependiente (*van der Mei et al, 2006*). La alta densidad de los B-PD creados *in vivo*, puede limitar la profundidad de penetración del láser de la CLSM (excitación convencional de un fotón) a 40-100 μm de los grupos bacterianos más externos del biofilm; ésto podría significar que las áreas más

profundas no se visualizan de forma fidedigna (*van der Mei et al, 2006; von Ohle et al, 2010*). *Kawaguchi y Decho* (*Kawaguchi y Decho, 2002*) demostraron que la CLSM con excitación de dos fotones podría alcanzar mayor profundidad en la profundidad del biofilm y en consecuencia mejorar la resolución.

Schaudinn et al (*Schaudinn et al, 2009*) propusieron combinar más de una técnica de microscopía para proporcionar información que en ocasiones puede ser difícil o incluso imposible de obtener mediante un método de imagen simple, en una estructura como el biofilm. Sin embargo, la aplicación de técnicas combinadas de microscopía para la caracterización de los B-PD *in vivo* ha sido desestimada (*Wrede et al, 2008*), y pocos autores han utilizado con esta finalidad la CLSM en combinación con otras técnicas como la SEM, la TEM o la microscopía de epifluorescencia (*Wood et al, 2000; Perez Davidi et al, 2007; Schaudinn et al, 2009; Jung et al, 2010*).

El sistema BacLight con SYTO 9 y PI, y evaluación de las imágenes mediante CLSM, es una herramienta eficaz para analizar la vitalidad bacteriana en biofilms dentales (*Tawakoli et al, 2013*). En el presente estudio de diseño cruzado se evaluaron un total de 24 campos en cada participante al finalizar cada intervención (4 campos por disco en cada uno de los 6 discos), con lo cual se redujo considerablemente el sesgo potencial inherente a esta modalidad técnica. Algunos autores sin embargo, recomiendan complementar los resultados del BacLight con otras técnicas moleculares, microbiológicas o incluso de fluorescencia (*Quintás et al, 2015b*).

5.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

5.2.1. Características del B-PD basal

5.2.1.1. Grosor

La organización espacial y el desarrollo de los biofilms orales han sido profusamente estudiados en modelos *in vitro* (Kolenbrander *et al*, 1999; Guggenheim *et al*, 2001; Palmer *et al*, 2001; Foster y Kolenbrander, 2004). Sin embargo, se han descrito muy pocos modelos que permitan analizar *in vivo* la composición y el desarrollo de este biofilm (Wecke *et al*, 2000; Palmer *et al*, 2001; Wood *et al*, 2002; Foster *et al*, 2003; Arweiler *et al*, 2004; Kolenbrander *et al*, 2005).

Netuschil *et al* (Netuschil *et al*, 1998) sugirieron que el grosor del B-PD depende de cada sujeto y del período de maduración del biofilm. Esta gran variabilidad interindividual ha sido posteriormente constatada por numerosos autores (Auschill *et al*, 2001; Auschill *et al*, 2004; Dige *et al*, 2009). En este sentido, Auschill *et al* (Auschill *et al*, 2001) afirmaron que el grosor del biofilm “depende del ritmo de formación de placa de los donantes individuales”. Sin embargo, Zaura-Arite *et al* (Zaura-Arite *et al*, 2001) no encontraron diferencias en el grosor de un B-PD de 2 días entre individuos hiper- e hipo-productores de placa (clasificados en base al acúmulo medio de proteínas en muestras de placa joven), aunque estos autores emplearon un dispositivo ranurado para favorecer el crecimiento del biofilm. En esta misma línea, Arweiler *et al* (Arweiler *et al*, 2004; Arweiler *et al*, 2008) demostraron que el riesgo de caries -evaluado en base a la concentración de *Streptococcus mutans*-, el número de dientes cariados, ausentes y obturados, el flujo salival y la tasa de formación de ácido láctico, no tenían ninguna relación con el grosor del B-PD a las 48 horas ni a los 5 días de maduración. En otros estudios sobre B-PD realizados *in vivo*, se evaluó el impacto de algunos factores locales sobre el grosor del biofilm en un mismo individuo, incluyendo el modelo de dispositivo intraoral utilizado para su recogida (Wood *et al*, 2000), el tipo de sustrato (Netuschil *et al*, 1998; Wood *et al*, 2000; Auschill *et al*, 2001; Zaura-Arite *et al*, 2001; Arweiler *et al*, 2004; Gu *et al*, 2005; Al-Ahmad *et al*, 2007; Dige *et al*, 2009) o incluso la variabilidad entre diferentes zonas del mismo sustrato (Arweiler *et al*, 2004).

Al-Ahmad *et al* (Al-Ahmad *et al*, 2007) observaron que el grosor del B-PD, que se formaba sobre fragmentos de esmalte bovino fijados en un dispositivo de

acrílico individualizado, aumentaba de $14 \pm 5 \mu\text{m}$ el primer día, hasta $49 \pm 11 \mu\text{m}$ a los 7 días. Paradójicamente, se ha demostrado que este incremento del grosor del biofilm no es uniformemente progresivo (*Al-Ahmad et al, 2007; Al-Ahmad et al, 2010*). La influencia significativa del factor “edad” de la placa ha sido corroborada en estudios recientes, en los que se analizaron períodos cortos de exposición oral, como los publicados por Dige et al (*Dige et al, 2009*) (B-PD de 6 horas, 12 horas, 1 día y 2 días) y por Jung et al (*Jung et al, 2010*) (B-PD de 30 minutos, 2 horas y 6 horas). No obstante, se ha señalado que los acúmulos bacterianos a los 2 días -al igual que en estadios previos- no tienen un grosor uniforme (*Dige et al, 2007*) y algunos autores han sugerido que no existen diferencias significativas en el grosor medio de un B-PD de 2 y 4 días (*Prada López et al, 2015*).

El valor medio del grosor del B-PD de 4 días analizado en el presente estudio fue de $20 \mu\text{m}$, y resultó similar al obtenido por otros autores como Jentsch et al (*Jentsch et al, 2002*), Arweiler et al (*Arweiler et al, 2008*) y Quintás et al (*Quintás et al, 2015b*), en un B-PD de 3, 4 y 5 días respectivamente. Sin embargo, este grosor resultó considerablemente inferior al registrado en otros trabajos que comentaremos a continuación (*Wood et al, 2000; Auschill et al 2005; Shen et al, 2011; Gu et al, 2012*).

Wood et al (*Wood et al, 2000*), en un estudio *in vivo* utilizando un B-PD de 4 días de evolución, encontraron valores de grosor que oscilaban entre $35\text{-}215 \mu\text{m}$ en los bordes del dispositivo y $75\text{-}220 \mu\text{m}$ en el centro; una característica metodológica importante es que el análisis se realizó con microscopía electrónica de transmisión, con la que son frecuentes los artefactos especialmente en las estructuras que están rellenas de fluido, ya que requiere la fijación y el secado de la muestra.

Shen et al (*Shen et al, 2011*) obtuvieron un biofilm de $57 \mu\text{m}$ de grosor a los 2 días, que continuó aumentando hasta alcanzar $155 \mu\text{m}$ a las 3 semanas, $190 \mu\text{m}$ a las 6 semanas y $201 \mu\text{m}$ a las 12 semanas. Sin embargo, estos resultados no son comparables a los del presente estudio, ya que si bien se trataba de un biofilm multiespecies derivado de placa dental, éste se recogió en discos de hidroxipatita recubiertos de colágeno, se enriquecía con medios de cultivo específicos y se le incorporaban semanalmente nutrientes frescos.

Auschill et al (*Auschill et al 2005*) y Gu et al (*Gu et al, 2012*), introdujeron una variante metodológica sustancial con respecto a nuestro estudio, ya que determinaron el grosor del B-PD en base al número de planos de $1 \mu\text{m}$ obtenidos mediante CLSM, independientemente de su perpendicularidad; en consecuencia, una mínima inclinación del sustrato podría provocar una sobrestimación del grosor del B-PD. En el presente estudio se evitó este sesgo potencial, ya que empleamos el soporte informático SPII del microscopio Confocal Leica para

determinar la distancia exacta entre el sustrato y el punto más alto del B-PD, en un plano perpendicular al del sustrato.

5.2.1.2. Vitalidad

En algunos estudios, en los que se aplicaron técnicas convencionales de cultivo microbiológico y fluorescencia vital, se demostró que en la placa dental joven y escasa predominaba la materia muerta sobre los microorganismos vivos (Netuschil *et al*, 1995; Weiger *et al*, 1995; Weiger *et al*, 1997). En la misma línea, en 1998, Netuschil *et al* (Netuschil *et al*, 1998), analizando *in vivo* especímenes de B-PD de 1, 2 y 3 días mediante CLSM, localizaron bacterias vivas preferentemente en la parte superior de un estrato denso de material muerto. Por el contrario, Zaura-Arite *et al* (Zaura-Arite *et al*, 2001) observaron, en muestras de B-PD de 2 días, que los acúmulos de bacterias vivas se entremezclaban con material muerto; este hallazgo sustentaría la hipótesis de que las bacterias muertas, más que las vivas, se adhieren a superficies sólidas, aunque otra posible explicación radicaría en los factores antibacterianos presentes en la saliva humana y en sus efectos sobre el B-PD (Scannapieco, 1994; Kage y Bernimoulin, 1995; Tenovuo 1998; Weiger *et al*, 1999). Recientemente, Yan He *et al* (He *et al*, 2013), han replanteado la propuesta de que los microorganismos muertos predominan en los estratos más profundos del biofilm, argumentando la dificultad que tienen los nutrientes para alcanzar estas regiones internas.

Los microorganismos vivos, localizados sobre estos estratos muertos o embebidos en ellos, pueden ser responsables del ulterior crecimiento de la placa (Netuschil *et al*, 1998). Las bacterias muertas proporcionan suplementos nutritivos que favorecen el rápido crecimiento de la flora viva (Critchley 1969; Wimpenny 1995; Netuschil *et al*, 1998) y la protegen contra los agentes antibacterianos del propio ecosistema oral (Auschill *et al*, 2001). En consecuencia, se ha determinado que el material celular muerto representa un componente primordial de la biomasa durante los estadios iniciales de acumulación y desarrollo del B-PD (Netuschil *et al*, 1998; Auschill *et al*, 2001). En estos biofilms se han descrito estructuras cavitadas (“agujeros negros”) rodeadas por bacterias vivas, lo que podría significar que estas bacterias tienen acceso directo a los nutrientes que difunden a través de poros y oquedades (Lawrence *et al*, 1991; de Beer *et al*, 1994; Singleton *et al*, 1997).

En diversos estudios realizados *in vivo* en B-PD de 2-3 días de maduración, se alcanzó una vitalidad bacteriana media del 60-77% (Arweiler *et al*, 2004; Auschill *et al*, 2005; von Ohle *et al*, 2010; Gu *et al*, 2012; García-Caballero *et al*, 2013; Quintás *et al*, 2015a). Algunos autores han señalado que la vitalidad bacteriana aumenta a medida que lo hace el período de maduración del biofilm y consecuentemente su grosor (Auschill *et al*, 2001; Zaura-Arite *et al*,

2001). En el presente estudio, la vitalidad bacteriana media fue del 49%, resultando similar a la de otras series con B-PD de 4-5 días (Arweiler et al, 2008; Quintás et al, 2015b), confirmando que a diferencia del grosor la vitalidad bacteriana disminuye con la maduración del biofilm (Prada López et al, 2015b).

Se han descrito grandes diferencias inter-individuales en la disposición de las bacterias vivas y muertas, por lo que no parece existir un patrón general de distribución de la vitalidad bacteriana (Zaura-Arite, 2001; von Ohle et al, 2010). Por el contrario, Arweiler et al (Arweiler et al, 2004) sugirieron que en cada participante en estos estudios existía un ambiente ecológico relativamente constante, lo que obviamente conduce a un patrón de identidad microbiana. En este sentido, estos investigadores (Arweiler et al, 2004) identificaron 3 patrones de vitalidad en un B-PD de 2 días: en el primero, un gran número de bacterias muertas (vitalidad baja) se acumulaban en las capas más próximas al sustrato, la vitalidad aumentaba en los estratos intermedios y terminaba nuevamente con valores bajos en los estratos más superficiales del biofilm; en el segundo patrón, cuando estas bacterias eran recubiertas por células vivas, o proliferaban algunas de las bacterias que todavía sobrevivían o eran cultivables, formaban una nueva capa de B-PD vital; en el tercer patrón, el biofilm exhibía valores elevados de vitalidad bacteriana en la capa próxima al sustrato, disminuyendo progresivamente hacia el exterior.

Auschill et al (Auschill et al, 2001), observaron que la distribución de la vitalidad bacteriana en B-PD acumulados durante 5 días tenía un perfil similar al primer patrón descrito, ya que el porcentaje de bacterias vivas era más bajo en el área adyacente a la superficie del esmalte, aumentaba siguiendo el eje z hacia la zona central y disminuía nuevamente hacia los estratos más superficiales. Por el contrario, Arweiler et al (Arweiler et al, 2008) demostraron en un B-PD de 5 días, un patrón de vitalidad bacteriana más parecido al segundo de los que hemos descrito, con valores más bajos en los estratos inferiores y más altos en las capas superficiales, confirmando que las bacterias próximas al sustrato suelen ser metabólicamente inactivas (zonas latentes) (ten Cate y Marsh, 1994; Netuschil et al, 1998).

Arweiler et al (Arweiler et al, 2004) describieron una gran variabilidad no sólo inter-individual sino también intra-individual (entre las diferentes capas del biofilm) en un B-PD de 2 días. Sin embargo, estos mismos autores (Arweiler et al, 2008), en un trabajo publicado posteriormente, no detectaron diferencias estadísticamente significativas en la vitalidad bacteriana entre las capas basal, intermedia y superficial de un B-PD de 5 días.

En el presente trabajo, el promedio de vitalidad del B-PD después de 4 días de formación fue del 79% en las capas más superficiales y del 15% en los estratos más profundos, coincidiendo este hallazgo con el de otros estudios

previos (*Netuschil et al, 1998*). Este patrón se corresponde con uno de los descritos por Arweiler et al (*Arweiler et al, 2004*), refrenda la hipótesis de que las bacterias del estrato basal están en un estado de inactividad metabólica (*Koo et al, 2006*), y confirma la importancia del material celular muerto en los estadios iniciales del acúmulo y desarrollo del B-PD, favoreciendo particularmente su crecimiento y protegiéndolo de los agentes antimicrobianos del medio oral (*Netuschil et al, 1998; Auschill et al, 2001*).

5.2.1.3. Área ocupada

Se ha demostrado que la morfología y la composición bacteriana de un B-PD varían sustancialmente entre el segundo y el cuarto día de maduración; simultáneamente, el área del sustrato cubierta por biofilm aumenta significativamente (*Prada López et al, 2015b*).

En el presente trabajo, el área media ocupada en un B-PD de 4 días de evolución fue del 78%, aunque se detectó una gran variabilidad interindividual. Este porcentaje resultó similar al observado por otros autores también en un B-PD de 4 días, tanto *in vitro*, como en el estudio de Al-Ahmad et al (*Al-Ahmad et al, 2008*) con el 77%, como *in situ*, en consonancia con los trabajos de Prada López et al (*Prada López et al, 2015b*) con el 70% o Quintás et al (*Quintás et al, 2015b*) con el 75%.

El área del sustrato cubierta por biofilm mantenía una correlación estadísticamente significativa con su grosor medio ($p < 0,05$), pero no con la vitalidad bacteriana. Aunque no hemos encontrado publicaciones específicas a este respecto en B-PD de 4 días *in situ*, este hallazgo podría expresar la capacidad adaptativa de los microorganismos del biofilm a las condiciones del entorno (*Al-Ahmad et al, 2008*).

5.2.2. Características del B-PD tras administrar clorhexidina 0,20%

Aunque se han publicado numerosos trabajos sobre la actividad antimicrobiana de la CHX sobre el B-PD *in vitro* (*Kinniment et al, 1996; Wilson, 1996; Pratten et al, 1998; Wilson et al, 1998; Pratten y Wilson, 1999; Hope y Wilson, 2004; Pan et al, 2010; Guggenheim y Meier, 2011*), los estudios *in situ* sobre los efectos de los agentes antimicrobianos en el B-PD, aplicados durante intervalos de tiempo definidos, y evaluados mediante CLSM y técnicas de vitalidad bacteriana, son escasos. Estos trabajos pueden analizarse diferenciando entre los que investigan el efecto antimicrobiano de una aplicación única (*Zaura-Arite et al, 2001; von Ohle et al, 2010; García-Caballero et al, 2013; Quintás et al, 2015a*) y aquéllos que, al igual que en el presente estudio, cuantifican la

eficacia de múltiples aplicaciones (*Auschill et al, 2005; Arweiler et al, 2008; Quintás et al, 2015b*).

5.2.2.1. Grosor

Se han publicado algunos estudios cuyo objetivo fue evaluar el efecto de la CHX sobre el biofilm oral *in situ*, que incurrieron en un problema metodológico común, ya que la placa dental se desestructuró para evaluar otros parámetros como la vitalidad bacteriana, por lo que en estos trabajos resultó inviable cuantificar el grosor del biofilm (*Arweiler et al, 2006; Singh et al, 2013*).

En el presente estudio, el valor medio del grosor del B-PD tras 4 días de administración de CHX cada 12 horas fue de 6 μm , lo que supuso una reducción del 70% con respecto al grosor basal. Este resultado coincide con el obtenido recientemente por Quintás et al (*Quintás et al, 2015b*), que aplicaron la misma secuencia metodológica. En un estudio previo publicado en 2005 por Auschill et al (*Auschill et al, 2005*), en el que la CHX al 0,2% se utilizó durante 2 días, el porcentaje de reducción del grosor alcanzó el 89%. Por su parte, en 2008, Arweiler et al (*Arweiler et al, 2008*) también describieron una reducción significativa del grosor en torno al 57% en un B-PD de 5 días (grosor medio basal= 25 μm y tras la administración de CHX= 11 μm).

Una variable poco analizada en la literatura es la posología de la CHX, en términos de concentración del principio activo y de la cadencia de su administración. Se ha descrito un grosor medio del B-PD tras la administración de CHX al 0,12% durante 3 ó 4 días, de 14 μm y 17 μm , respectivamente (*Jentsch et al, 2002; Jentsch et al, 2013*); este hallazgo parece sugerir que la reducción del grosor del B-PD es dosis-dependiente, aunque hay que tener en cuenta que en ambos artículos a diferencia del presente estudio las técnicas de microscopía empleadas para visualizar la microestructura de los biofilms fueron la TEM y la SEM. En nuestro trabajo, la cadencia de administración de la CHX (cada 12 horas *versus* cada 8 horas) no pareció condicionar significativamente su eficacia en términos de reducción del grosor del B-PD, aunque realizando los enjuagues cada 8 horas el grosor medio del B-PD fue de tan solo 3 μm ; no hemos encontrado ninguna publicación hasta la fecha en la que se haya explorado esta variable, por lo que no podemos cotejar este resultado con los obtenidos por otros autores.

5.2.2.2. Vitalidad

Los resultados de los estudios sobre vitalidad bacteriana están condicionados por el porcentaje de bacterias vivas detectado en el B-PD basal, que a su vez depende de múltiples factores ambientales como el aporte de nutrientes y metodológicos como los fluorocromos empleados; en consecuencia,

la diferencia porcentual entre la vitalidad bacteriana en condiciones basales y tras la aplicación de un antimicrobiano puede ser más relevante que los valores absolutos obtenidos.

El primer artículo en el que se evaluó *in vivo* la actividad antibacteriana de la CHX al 0,2% fue publicado hace 10 años por Auschill et al (*Auschill et al, 2005*); en dicho trabajo, los participantes llevaron una férula intraoral con discos de vidrio durante 2 días y realizaron enjuagues con el antiséptico cada 12 horas; las bacterias vivas y muertas se cuantificaron mediante CLSM, utilizando como fluorocromos diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio; los resultados demostraron una reducción de la vitalidad del B-PD del 65% (66% basal y 23% tras completar el ciclo del antiséptico).

En esta misma línea, Arweiler et al (*Arweiler et al, 2008*) describieron una reducción de la vitalidad bacteriana del 62%, después de administrar CHX al 0,2% cada 12 horas durante 5 días; la vitalidad registrada en condiciones basales fue del 57% y cayó hasta el 22% con los enjuagues de CHX.

En el presente estudio, la vitalidad bacteriana del B-PD disminuyó desde el 49% basal hasta el 13%, lo que representa un porcentaje de reducción del 73%. Este resultado es similar al obtenido recientemente por Quintás et al (*Quintás et al, 2015b*) aplicando la misma metodología; estos autores detectaron un 77% de reducción, con un 57% basal y un 13% al completar la administración de CHX.

Los porcentajes de vitalidad observados tras la aplicación del antiséptico fueron inferiores a los de algunos estudios previos. Se ha sugerido que esta discrepancia podría deberse a diferencias metodológicas, como la realización de enjuagues activos frente a la inmersión de los discos en la solución antiséptica (*Arweiler et al, 2008*), con lo que desaparece la acción del lavado y de la musculatura perioral.

En nuestro estudio, al analizar la vitalidad bacteriana del B-PD por capas al completar el período de administración de la CHX, encontramos valores del 18%, 14% y 8%, en las capas superficial, intermedia y profunda, respectivamente. Estos porcentajes son similares a los registrados recientemente por Quintás et al (*Quintás et al, 2015b*), con un 17%, 14% y 9%, respectivamente. En ambos trabajos el patrón de vitalidad del B-PD fue descendente desde la superficie hacia los estratos más profundos, reproduciendo el observado en el B-PD basal, pero sólo en nuestro estudio la diferencia porcentual de vitalidad bacteriana entre la capa superficial y la más profunda alcanzó significación estadística.

En publicaciones previas, tras aplicar CHX, tampoco se observaron diferencias de la vitalidad bacteriana entre capas (*Auschill et al, 2005; Arweiler et al, 2008*). Paradójicamente, algunos de ellos señalaron que sobreviven más bacterias a la acción del antiséptico en los extractos superficiales que en los

profundos (Arweiler *et al*, 2008), lo cual nos obliga a plantear si la distribución arbitraria del B-PD en 3 capas es la más adecuada para proceder a su análisis.

La administración de CHX con una posología nueva, cada 8 horas, proporcionó una excelente actividad antibacteriana, registrándose una reducción del 97% con respecto a la vitalidad del B-PD basal; el porcentaje de vitalidad por capas osciló entre 1 y 2%. Sin embargo, cuando el último enjuague se efectuó por la mañana y la lectura de los discos por la tarde, los resultados fueron similares a los obtenidos con la pauta de administración cada 12 horas (vitalidad media del B-PD= 13% y por capas= 12-14%). No hemos encontrado en la literatura ningún artículo previo con el que podamos comparar estos hallazgos. Se ha sugerido que después de efectuar un único enjuague con CHX, la vitalidad bacteriana de un B-PD permanece estable durante 8-12 horas, independientemente del momento del día en el que se administra el antiséptico (Tomás *et al*, 2013). Esto permite especular en base a nuestros hallazgos, que si bien la cadencia de administración del antiséptico podría tener relevancia en términos de vitalidad bacteriana en un B-PD *de novo*, su eficacia está condicionada por variables relacionadas con el ritmo circadiano, como pueden ser la producción de saliva o la sustantividad del antiséptico en saliva durante la vigilia.

5.2.2.3. Área ocupada

El porcentaje de superficie del sustrato cubierto por el B-PD tras la administración de un agente antimicrobiano ha sido objeto de muy pocas investigaciones, probablemente porque sólo puede analizarse con algunas técnicas de microscopía como el CLSM. Su interés radica en que este parámetro, junto con el grosor del B-PD, están directamente relacionados con la actividad antiplaca del antiséptico testado (Quintás *et al*, 2015b). Nosotros encontramos un 21% del área ocupada tras la administración de CHX al 0,2% cada 12 horas durante 4 días, lo que representa una reducción del 73%. Este resultado fue inferior al obtenido *in vitro* por Al-Ahmad *et al* (Al-Ahmad *et al*, 2008) con un 91% de reducción (77% en el control negativo *versus* 7% al completar la pauta de CHX), pero similar al reportado recientemente por Quintás *et al* (Quintás *et al*, 2015b), empleando una metodología similar a la del presente trabajo, con un 73% de reducción (75% en el control negativo *versus* 20% al completar la pauta de CHX).

El área ocupada tras la administración del antiséptico cada 8 horas durante 4 días fue del 10%, lo que representa una reducción del 87% con respecto al porcentaje de cobertura basal y del 52% en relación a los resultados obtenidos con la aplicación cada 12 horas, aunque las diferencias observadas entre ambas pautas de administración no alcanzaron significación estadística.

No hemos encontrado en la literatura ninguna referencia con la que comparar nuestros resultados a este respecto.

En cualquier caso, los resultados obtenidos en el presente estudio deben contrastarse con los derivados de estudios clínicos, basados en la aplicación de antisépticos durante períodos de tiempo variables.

5.2.3. Características del B-PD tras administrar amoxicilina/ácido clavulánico

La administración pautaada durante 4 días de una dosis terapéutica de AMX-CLV no produjo ningún efecto sobre el B-PD en relación a su grosor (20 μ m), la vitalidad bacteriana (56%) ni el área del sustrato ocupada (67%). Los valores de todos estos parámetros fueron similares a los registrados en situación basal y a los obtenidos recientemente en el B-PD de un grupo control de individuos que efectuaron enjuagues cada 12 horas con agua estéril durante 4 días (*Quintás et al, 2015b*). El biofilm conservó su estructura habitual y, coincidiendo con la disposición del B-PD en situación basal, la vitalidad bacteriana disminuyó desde los estratos superficiales (74%) a los más profundos (32%).

Hasta la fecha, no hemos encontrado ningún estudio clínico ni microbiológico en el que se haya analizado *in vivo* el efecto de un antibiótico sistémico sobre un B-PD maduro, por lo que no podemos comparar nuestros hallazgos con los de estudios previos.

El primer argumento para justificar los resultados del presente trabajo es la propia farmacocinética de la combinación antibiótica administrada. Se ha sugerido que tanto AMX como CLV se distribuyen adecuadamente en la mayoría de los tejidos corporales, aunque los niveles que alcanzan en saliva son bajos; no hemos encontrado referencias a la concentración salival de CLV, pero los antibióticos beta-lactámicos como la AMX se clasifican entre los de “muy baja” distribución salival, con niveles que no llegan al 10% de su concentración sérica (*Soriano y Rodríguez-Cerrato, 2002*). En términos de farmacodinámica, en un grupo de niños con otitis media tratada con AMX-CLV, se demostró que las elevadas concentraciones locales detectadas en la orofaringe inmediatamente después de ingerir el antibiótico en suspensión, no alteraban sustancialmente la microflora regional (*Lund et al, 2001*).

Aún obviando su farmacocinética, la eficacia del antibiótico en el B-PD estaría además condicionada por otros factores comunes a biofilms de distinta naturaleza, como: la dificultad para alcanzar las zonas profundas del biofilm, la resistencia que desarrollan las bacterias expuestas a dosis subletales del antibiótico, la activación de genes de resistencia por parte de las bacterias sésiles,

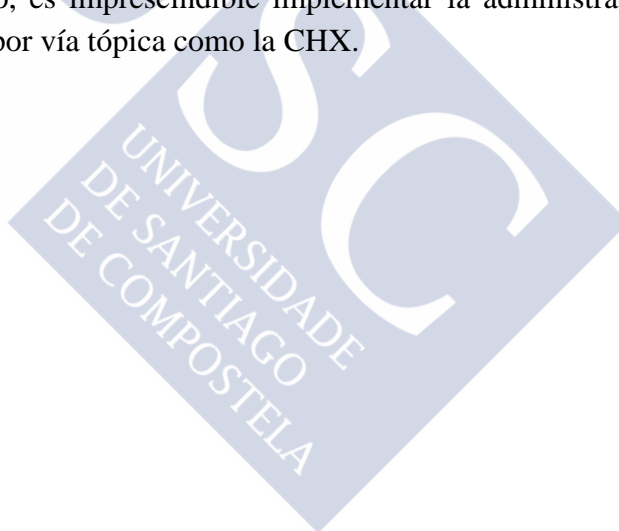
el predominio de bacterias en forma quiescente en zonas profundas del biofilm por el aporte limitado de nutrientes y la protección que proporciona la matriz de exopolisacáridos (*Donlan y Costerton, 2002; Socransky et al, 2013*). Por último, la topografía de un biofilm multiespecie como el B-PD y el hecho de que ya entre en fase estacionaria a las 24 horas, le dotan de una resistencia a los antibióticos entre 10 y 100 veces mayor que el de un biofilm monoespecie (*Park et al, 2014*).

Nuestros resultados obligan a replantear la eficacia del AMX-CLV para prevenir la aparición de infecciones locales y focales de origen oral, si la premisa inicial es su actividad antiplaca.

La caries es consecuencia de un desequilibrio en las poblaciones bacterianas de los considerados “biofilms naturales” y la causa más frecuente de infección odontogénica con expresión clínica (*Teles et al, 2006*); aunque empíricamente se ha sugerido que AMX-CLV es la combinación antibiótica más activa para combatir la infección odontogénica en base a sus características de farmacocinética/farmacodinámica (*Isla et al, 2008*), hasta la fecha no hemos encontrado ningún estudio que avale su aplicación para prevenir la aparición de caries. Lo mismo ocurre con la enfermedad periodontal, a pesar de que AMX-CLV esté incluida en la primera línea de antibioterapia para combatir las exacerbaciones de la periodontitis (*Liébana et al, 2004*), probablemente como consecuencia de la elevada prevalencia de especies productoras de beta-lactamasas en la flora subgingival (*Rams et al, 2013*); en términos de prevención, se han descrito fracasos de regeneración periodontal guiada con exposición y consiguiente contaminación bacteriana de la membrana, a pesar de la administración profiláctica postoperatoria de AMX-CLV (*De Sanctis et al, 1996*). Del análisis crítico de la literatura, se deduce que hay una evidencia moderada de que la profilaxis antibiótica con AMX-CLV reduzca el riesgo de alveolitis y otras complicaciones infecciosas postexodoncia (*Lodi et al, 2012*), pero en este caso el sustrato es un coágulo intraalveolar, sobre el que se desarrollará un biofilm cuya características estructurales y funcionales aún no se han descrito, pero que presumiblemente serán muy diferentes a las del B-PD; además, el antibiótico probablemente accede al lecho alveolar por vía hematógica y no vehiculado por la saliva.

La administración rutinaria de profilaxis antibiótica para reducir la incidencia de endocarditis en pacientes de riesgo todavía sigue siendo objeto de controversia (*Diz Dios, 2014*); recientemente, se ha sugerido que la combinación de AMX-CLV puede evitar la aparición de bacteriemias postexodoncia (*Álvarez, 2014*) una fase previa imprescindible para el desarrollo de endocarditis, aunque en este caso el antibiótico actúa presumiblemente a nivel del torrente circulatorio y de los órganos diana; sin embargo, un lavado preoperatorio de la cavidad oral con CHX al 0,2% disminuye significativamente la duración de las bacteriemias

secundarias a exodoncias (*Barbosa et al, 2015*), lo que obliga a pensar que reduce sustancialmente el inóculo bacteriano que conforma el B-PD. Se ha demostrado que la aplicación tópica de antisépticos como la CHX para descontaminar la cavidad oral, reduce la incidencia de neumonía nosocomial y de neumonía asociada a ventilación mecánica (*Li et al, 2013; Silvestri et al, 2014*); en algunos protocolos, para reducir las infecciones del tracto respiratorio también se incorporan antibióticos sistémicos, fundamentalmente en el marco de la “descontaminación selectiva del tracto digestivo”; cuando en los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos la profilaxis tópica se complementa con antibióticos sistémicos, se reducen las infecciones respiratorias y la mortalidad (*Liberati et al, 2009*); sin embargo, no existen ensayos concluyentes sobre la eficacia de la profilaxis exclusivamente con antibióticos por vía sistémica y en los que se han publicado la combinación AMX-CLV no representa el antibiótico de elección (*D’Amico et al, 2009*). En definitiva, en las situaciones clínicas en las que se opta por la prescripción de AMX-CLV para prevenir complicaciones infecciosas, el antibiótico no actúa sobre el B-PD y por extensión sobre la placa dental, por lo que si se pretende reducir localmente el tamaño de este inóculo bacteriano, es imprescindible implementar la administración de un antimicrobiano eficaz por vía tópica como la CHX.







6. CONCLUSIONES



- La clorhexidina al 0,20% administrada en enjuagues con una posología convencional (cada 12 horas) sobre un biofilm maduro de placa dental, es eficaz en términos de reducción del grosor del biofilm, del porcentaje de vitalidad bacteriana y de la superficie del sustrato que éste recubre.
- Entre una pauta de administración de clorhexidina cada 12 horas y otra cada 8 horas, no se observan diferencias significativas en términos de reducción del grosor del biofilm, del porcentaje de vitalidad bacteriana ni de la superficie del sustrato que éste recubre. Aunque la aplicación del antiséptico cada 8 horas exhibió una excelente actividad antibacteriana, las primeras fases de formación del biofilm *de novo* parecen estar más condicionadas por factores relacionados con el ritmo circadiano, que por las diferencias observadas entre ambas pautas de administración de la clorhexidina.
- La administración de amoxicilina-ácido clavulánico por vía enteral no tiene ninguna repercusión sobre un biofilm maduro de placa dental, cuando se analiza su grosor, el porcentaje de vitalidad bacteriana y la superficie del sustrato que éste recubre.





7. BIBLIOGRAFÍA



- Adalja AA.** Center for Biosecurity of UPMC comments on HHS action plan to prevent healthcare-associated infections. *Biosecur Bioterror* 2010; 8: 377-378.
- Aimetti M, Romano F, Nessi F.** Microbiologic analysis of periodontal pockets and carotid atheromatous plaques in advanced chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2007; 78: 1718-1723.
- Akota I, Alvsaker B, Bjørnland T.** The effect of locally applied gauze drain impregnated with chlortetracycline ointment in mandibular third molar surgery. *Acta Odontol Scand* 1998; 56; 25-29.
- Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Faust J, Bächle M, Follo M, Wolkewitz M, Hanning C, Hellwig E, Carvalho C, Kohal R.** Biofilm formation and composition on different implant materials in vivo. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 95: 101-109.
- Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Ausschill TM, Follo M, Braun G, Hellwig E, Arweiler NB.** Effects of commonly used food preservatives on biofilm formation of *Streptococcus mutans* in vitro. *Arch Oral Biol* 2008; 53: 765-772.
- Al-Ahmad A, Wunder A, Ausschill TM, Follo M, Braun G, Hellwig E, Arweiler NB.** The in vivo dynamics of *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* spp. in dental plaque biofilm as analysed by five colour multiplex fluorescence in situ hybridization. *J Med Microbiol* 2007; 56: 681-687.
- Alexander RE.** Dental Extraction would management. A case against medicating postextraction sockets. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58: 538-551.
- Allison C, Simor AE, Mock D, Tenenbaum HC.** Prosol-chlorhexidine irrigation reduces the incidence of bacteremia during ultrasonic scaling with the Cavi-Med: a pilot investigation. *J Can Dent Assoc* 1993; 59: 673-682.
- Al-Tannir MA, Goodman HS.** A review of clorhexidine and its use in special populations. *Spec Care Dentist* 1994; 14: 116-122.
- Álvarez FJ.** Evaluación de una nueva pauta de profilaxis antimicrobiana para prevenir bacteriemias secundarias a la práctica de exodoncias. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, 2014.
- Amin AN, Feinbloom D, Krekun S, Li J, Pak M, Rauch DA, Borik A.** Recommendations for management of community-and hospital-acquired pneumonia- the hospitalist perspective. *Curr Opin Pulm Med* 2004; 10: 23-27.
- Amir A, James LL.** Systematic Review of the association between respiratory disease and oral health. *J Periodontol* 2006; 77: 1465-1482.
- Arévalo JM, Arribas JL, Calbo L, Hernández MJ, Lizán M, Herruzco R.** Guía del grupo de trabajo sobre desinfectantes y antisépticos. Revisión 1998. *Medicina Preventiva* 1998; 4:38-43.

- Ariza E, Gonzalez J, Boneu F, Hueto JA, Raspall G.** Incidencia de la alveolitis seca, tras la exodoncia quirúrgica de terceros molares mandibulares en nuestra Unidad de Cirugía Oral. *Rev Esp Cir Oral Maxilofac* 1999; 21: 214-219.
- Arteagoitia I, Diez A, Barbier L, Santamaria G, Santamaria J.** Efficacy of amoxicillin/clavulanic acid in preventing infectious and inflammatory complications following impacted mandibular third molar extraction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100: 11-18.
- Arweiler NB, Boehnke N, Sculean A, Hellwig E, Auschill TM.** Differences in efficacy of two commercial 0.2% chlorhexidine mouthrinse solutions: a 4-days plaque re-growth study. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 334-339.
- Arweiler NB, Hellwig E, Sculean A, Hein N, Auschill TM.** Individual vitality pattern of in situ dental biofilms at different locations in the oral cavity. *Caries Res* 2004; 38: 442-447.
- Arweiler NB, Lenz R, Sculean A, Al-Ahmad A, Hellwig E, Auschill TM.** Effect of food preservatives on in situ biofilm formation. *Clin Oral Invest* 2008; 12: 203-208.
- Asad S, Opal SM.** Bench-to-bedside review: *quorum sensing* and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. *Crit Care* 2008; 12: 236-247.
- Ataoglu H, Oz GY, Candirli C, Kizilo Lu D.** Routine antibiotic prophylaxis is not necessary during operations to remove third molars. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2008; 46: 133-135.
- Atar S, Tolstrup K, Cercek B, Siegel RJ.** *Chlamydia pneumonia* antibody titers and cardiac calcifications: a cross-sectional serological-echocardiographic correlative study. *Isr Med Assoc J* 2007; 9: 517-520.
- Atkinson BA, Abu-Al-Jaibat A, LeBlanc DJ.** Antibiotic resistance among enterococci isolated from clinical specimens between 1953 and 1954. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1598-1600.
- Auschill TM, Arweiler NB, Brex M, Reich E, Sculean A, Netuschil L.** The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur J Oral Sci* 2002; 110: 48-53.
- Auschill TM, Arweiler NB, Netuschil L, Brex M, Reich E, Sculean A.** Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol* 2001; 46: 471-476.
- Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB.** Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 147-152.
- Auschill TM, Hellwig E, Sculean A, Hein N, Arweiler NB.** Impact of the intraoral location on the rate of biofilm growth. *Clin Oral Invest* 2004; 8: 97-101.

- Babar A, Ibrahim MW, Baig NJ, Shah I, Amin E.** Efficacy of intra-alveolar chlorhexidine gel in reducing frequency of alveolar osteitis in mandibular third molar surgery. *J Coll Physicians Surg Pak* 2012; 22: 91-94.
- Bahekar AA, Singh S, Molnar J, Arora R.** The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. *Am Heart J* 2007; 154: 830-837.
- Balaban N, Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Braunstein JB, Silvestri C, Mocchegiani F, Saba V, Scalise G.** Treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infection by the quorum- sensing inhibitor RIP. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2226-2229.
- Balaban N, Giacometti A, Girioni O, Gov Y, Ghiselli R, Mocchegiani F, Viticchi C, Del Prete MS, Saba V, Scalise G, Dell'Acqua G.** Use the quorum- sensing inhibitor RNAIII-inhibiting peptide to prevent biofilm formation *in vivo* by drug resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 2003; 187: 625-630.
- Baldassarri L, Creti R, Arciola CR, Montanaro L, Venditti M, Di Rosa R.** Analysis of virulence factors in cases of enterococcal endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 1006-1008.
- Barbosa M, Prada-López I, Álvarez M, Amaral B, de los Angeles CD, Tomás I.** Post-tooth extraction bacteraemia: a randomized clinical trial on the efficacy of chlorhexidine prophylaxis. *PLoS One*. 2015; 10: e0124249.
- Barcat JA.** Biofilms. *Medicina (B Aires)* 2005; 65: 369-372.
- Barclay JK.** Metronidazole and dry socket: prophylactic use in mandibular third molar removal complicated by nonacute pericoronitis. *N Z Dent J* 1987; 83: 71-75.
- Barsum W, Wilson R, Read RC, Rutman A, Todd HC, Houdred N, Roussel P, Cole PJ.** Interaction of fimbriated and nonfimbriated strains of unencapsulated *Haemophilus Influenzae* with human respiratory tract mucus *in vitro*. *Eur Resp J* 1995; 8: 709-714.
- Bartlett JG, Finegold SM.** Anaerobic infections of the lung and pleural space. *Am Rev Resp Dis* 1974; 110: 56-57.
- Beck JD, Eke P, Heiss G, Madianos P, Couper D, Lin D, Moss K, Elter J, Offenbacher S.** Periodontal disease and coronary heart disease: a reappraisal of the exposure. *Circulation* 2005; 112: 19-24.
- Bellissimo-Rodrigues F, Bellissimo-Rodrigues WT, Viana JM, Teixeira GC, Nicolini E, Auxiliadora-Martins M, Passos AD, Martinez EZ, Basile-Filho A, Martinez R.** Effectiveness of oral rinse with chlorhexidine in preventing nosocomial respiratory tract infections among intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009; 30: 952-958.
- Bergdahl M, Hedstrom L.** Metronidazole for the prevention of dry socket after removal of partially impacted mandibular third molar: a randomised controlled trial. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2004; 42: 555-558.

- Bergmans DC, Bonten MJ, Gaillard CA, Paling JC, van der Geest S, van Tiel FH, Beysens AJ, de Leeuw PW, Stobberingh EE.** Prevention of Ventilator-associated Pneumonia by Oral Decontamination: a Prospective, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 382-388.
- Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU, Egli T.** Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 3283-3290.
- Berwick JE, Lessin ME.** Effects of a chlorhexidine gluconate oral rinse on the incidence of alveolar osteitis in mandibular third molar surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1990; 48: 444-448.
- Bezerra TP, Studart-Soares EC, Scaparo HC, Pita-Neto IC, Batista SH, Fonteles CS.** Prophylaxis versus placebo treatment for infective and inflammatory complications of surgical third molar removal: a split-mouth, double-blind, controlled, clinical trial with amoxicillin (500 mg). *J Oral Maxillofac Surg* 2011; 69: 333-339.
- Biggerstaff JP, Le Puil M, Weidow BL, Prater J, Glass K, Radosevich M, White DC.** New methodology for viability testing in environmental samples. *Mol Cell Probes* 2006; 20: 141-146.
- Birn H.** Bacterial and fibrinolytic activity in "dry socket". *Acta Odontol Scand* 1970; 28: 773-783.
- Birn, H.** Etiology and pathogenesis of fibrinolytic alveolitis ("dry socket"). *Int J Oral Surg* 1973; 2: 211-267.
- Blum IR.** Contemporary views on dry socket (alveolar osteitis): a clinical appraisal of standardization, aetiopathogenesis and management: a critical review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31: 309-317.
- Bonine FL.** Effect of chlorhexidine rinse on the incidence of dry socket in impacted mandibular third molar extraction sites. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 79: 154-157; discussion 157-158.
- Bortoluzzi MC, Manfro R, De Déa BE, Dutra TC.** Incidence of dry socket, alveolar infection, and postoperative pain following the extraction of erupted teeth. *J Contemp Dent Pract* 2010; 11: 33-40.
- Bosco JM, de Oliveira SR, Bosco AF, Schweitzer CM, Jardim Jr EG.** Influence of local tetracycline on the microbiota of alveolar osteitis in rats. *Braz Dent J* 2008; 19: 119-123.
- Bowden GH, Li YH.** Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res* 1997; 11: 81-99.
- Bowe DC, Rogers S, Stassen LF.** The management of dry socket/alveolar osteitis. *J Ir Dent Assoc* 2011; 57: 305-310.

- Bradshaw DJ, Homer KA, Marsh PD, Beighton D.** Metabolic cooperation in oral microbial communities during growth on mucin. *Microbiology* 1994; 140: 3407-3412.
- Bradshaw DJ, Marsh PD, Allison C, Schilling KM.** Effect of oxygen, inoculum composition and flow rate on development of mixed culture oral biofilms. *Microbiology* 1996; 142: 623-629.
- Brekke JH, Bresner M, Reitman MJ.** Effect of surgical trauma and polylactate cubes and granules on the incidence of alveolar osteitis in mandibular third molar extraction wounds. *J Can Dent Assoc* 1986; 52: 315-319.
- Brook I, Frazier EH.** Aerobic and anaerobic microbiology of empyema. A retrospective review in two military hospitals. *Chest* 1993; 103: 1502-1507.
- Brown AR, Papasian CJ, Shultz P, Theisen FC, Shultz RE.** Bacteremia and intraoral suture removal: can an antimicrobial rinse help?. *J Am Dent Assoc* 1998; 129: 1455-1460.
- Brown MR, Allison DG, Gilbert P.** Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect?. *J Antimicrob Chemother* 1988; 22: 777-780.
- Burne RA.** Concise review. Oral streptococci, products of their environment. *J Dent Res* 1998; 77: 445-452.
- Busscher HJ, Bos R, van der Mei HC.** Initial microbial adhesion is a determinant for the strenght of biofilm adhesion. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 128: 229-234.
- Buyukhatipoglu H, Tiryaki O, Tahta K, Usalan C.** Inflammation as a risk factor for carotid intimal-medial thickening. A measure of subclinical atherosclerosis in haemodialysis patients: the role of *Chlamydia* and *Cytomegalovirus* infection. *Nephrology* 2007; 12: 25-32.
- Bystedt H, Nord CE, Nordenram A.** Effect of azidocillin, erythromycin, clindamycin and doxycycline on postoperative complications after surgical removal of impacted mandibular third molars. *Int J Oral Surg* 1980; 9: 157-165.
- Carbajal C, Pobo A, Diaz E, Lisboa T, Llauradó M, Rello J.** Oral hygiene with chlorhexidine on the prevention of ventilador-associated pneumonia in intubated patients: a systematic review of randomized clinical trials. *Med Clin* 2010; 135: 491-497.
- Caso A, Hung LK, Beirne OR.** Prevention of alveolar osteitis with chlorhexidine: a meta-analytic review. *Oral Surg Oral med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99: 155-159.
- Catellani JE, Harvey S, Erickson SH, Cherkin D.** Effect of oral contraceptive cycle on dry socket (localized alveolar osteitis). *J Am Dent Assoc* 1980; 101: 777-780.
- Centers for Diseases Control and Prevention, National Center for Environmental Health.** Factes about chronic obstructive pulmonary

disease (COPD). Available at: <http://www.cdc.gov/nceh/airpollution/copd/copdfaq.pdf>. (acceso octubre 2014).

- Chalmers NI, Palmer RJ Jr, Du-Thumm L, Sullivan R, Shi W, Kolenbrander PE.** Use of quantum dot luminescent probes to achieve single-cell resolution of human oral bacteria in biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 630-636.
- Chan EY, Ruest A, Meade MO, Cook DJ.** Oral decontamination for prevention of pneumonia in mechanically ventilated adults: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2007; 334: 889.
- Chastre J, Fagon J.** Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 867-903.
- Chawner JA, Gilbert P.** A comparative study of the bactericidal and growth inhibitory activities of the bisbiguanides alexidine and chlorhexidine. *J Appl Bacteriol* 1989a; 66: 243-252.
- Chawner JA, Gilbert P.** Interaction of the bisbiguanides chlorhexidine and alexidine with phospholipid-vesicles: evidence for separate modes of action. *J Appl Bacteriol* 1989b; 66: 253-258.
- Chen AC, Liu CC, Yao WJ, Chen CT, Wang JY.** *Actinobacillus actinomycetencomitans* pneumonia with chest wall and subphrenic abscess. *Scand J Infect Dis* 1995; 27: 289-290.
- Chen L, Wen YM.** The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *Int J Oral Sci* 2011; 3: 66-73.
- Chevret S, Hemmer M, Carlet J, Langer M.** Incidence and risk factors of pneumonia acquired in intensive care units. Results from a multicenter prospective study on 996 patients. European Cooperative Group on Nosocomial Pneumonia. *Intensive Care Med* 1993; 19: 256-264.
- Chlebicki MP, Safdar N.** Topical chlorhexidine for prevention of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis. *Crit Care Med* 2007; 35: 595-602.
- Cimasoni G, Ishikawa I, Jaccard F.** Enzyme activity in the gingival crevice. In: Lehner T, editor. Borderland between caries and periodontal disease. London: Acad Press 1977; 13-41.
- Colby RC.** The general practitioner's perspective of the etiology, prevention, and treatment of dry socket. *General Dent* 1997; 45: 461-472.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM.** Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 711-745.
- Costerton JW, Lewandowski Z.** The biofilm lifestyle. *Adv Dent Res* 1997; 11: 192-195.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-1322.
- Crawford JY.** Dry socket. *Dent Cosmos* 1896; 38: 929.

- Critchley P.** The breakdown of the carbohydrate and protein matrix of dental plaque. *Caries Res* 1969; 3: 249-265.
- Cueto A, Mes F, Bravo M, Ocaña-Riola R.** Periodontitis as risk factor for acute myocardial infarction. A case control study of Spanish adults. *J Periodontal Res* 2005; 40: 36-42.
- Curran JB, Kennett S, Young AR.** An assessment of the use of prophylactic antibiotics in third molar surgery. *Int J Oral Surg* 1974; 3: 1-6.
- D'Amico R, Pifferi S, Torri V, Brazzi L, Parmelli E, Liberati A.** Antibiotic prophylaxis to reduce respiratory tract infections and mortality in adults receiving intensive care. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; CD000022.
- Dajani AS, Taubert KA, Wilson W, Bolger AF, Bayer A, Ferrieri P, Gewitz MH, Shulman ST, Nouri S, Newburger JW, Hutto C, Pallasch TJ, Gage TW, Levison ME, Peter G, Zuccaro G Jr.** Prevention of bacterial endocarditis: recommendations by the American Heart Association. *J Am Med Assoc* 1997; 128: 1142-1151.
- Daly B, Sharif MO, Newton T, Jones K, Worthington HV.** Local interventions for the management of alveolar osteitis (dry socket). *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 12: CD006968.
- Darvishi Khezri H, Haidari Gorji MA, Morad A, Gorji H.** Comparison of the antibacterial effects of Matrica & Persica™ and chlorhexidine gluconate mouthwashes in mechanically ventilated ICU patients: a double blind randomized clinical trial. *Rev Chilena Infectol* 2013; 30: 361-373.
- Davies J, Carlstedt I, Nilsson AK, Hakansson A, Sabharwal H, van Alphen L, van Ham M, Svanborg C.** Binding of *Haemophilus influenzae* to purified mucins from the human respiratory tract. *Infect Immun* 1995; 63: 2485-2492.
- Davies W Jr, Buchs AU, Davies W.** The use of granular gelatin-tetracycline compound after third molar removal. *J Oral Surg* 1981; 39: 466-467.
- Dayer MJ, Chambers JB, Prendergast B, Sandoe JA, Thornhill MH.** NICE guidance on antibiotic prophylaxis to prevent infective endocarditis: a survey of clinicians' attitudes. *QJM* 2013; 106: 237-243.
- Dayer MJ, Jones S, Prendergast B, Baddour LM, Lockhart PB, Thornhill MH.** Incidence of infective endocarditis in England, 2000-13: a secular trend, interrupted time-series analysis. *Lancet* 2015; 285: 1219-1228.
- De Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z.** Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng* 1994; 43: 1131-1138.
- De Jonge E, Schultz MJ, Spanjaard L, Bossuyt PM, Vroom MB, Dankert J, Kesecioglu J.** Effects of selective decontamination of digestive tract on mortality and acquisition of resistant bacteria in intensive care: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 362: 1011-1016.

- De Sanctis M, Zucchelli G, Clauser C.** Bacterial colonization of bioabsorbable barrier material and periodontal regeneration. *J Periodontol* 1996; 67: 1193-1200.
- De Smet AM, Kluytmans JA, Cooper BS, Mascini EM, Benus RF, van der Werf TS, van der Hoeven JG, Pickkers P, Bogaers-Hofman D, van der Meer NJ, Bernardts AT, Kuijper EJ, Joore JC, Leverstein-van Hall MA, Bindels AJ, Jansz AR, Wesselink RM, de Jongh BM, Dennesen PJ, van Asselt GJ, te Velde LF, Frenay IH, Kaasjager K, Bosch FH, van Iterson M, Thijsen SF, Kluge GH, Pauw W, de Vries JW, Kaan JA, Arends JP, Aarts LP, Sturm PD, Harinck HI, Voss A, Uijtendaal EV, Blok HE, Thieme Groen ES, Pouw ME, Kalkman CJ, Bonten MJ.** Decontamination of the digestive tract and oropharynx in ICU patients. *N Engl J Med* 2009; 360: 20-31.
- Decker EM.** The ability of direct fluorescence-based, two-colour assays to detect different physiological states of oral streptococci. *Lett Appl Microbiol* 2001; 33: 188-192.
- Delibasi C, Saracoglu SH, Kesken A.** Effects of 0,2% chlorhexidine gluconate and amoxicillin plus clavulanic acid on the prevention of alveolar osteitis following mandibular third molar extractions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94: 301-304.
- Deo V, Bhongade ML, Ansari S, Chavan RS.** Periodontitis as a potential risk factor for chronic obstructive pulmonary disease. *Indian J Dent Res* 2009; 20: 466-470.
- DeRiso AJ 2nd, Ladowski JS, Dillon TA, Justice JW, Peterson AC.** Chlorhexidine gluconate 0,12% oral rinse reduces the incidence of total nosocomial respiratory infection and nonprophylactic systemic antibiotic use in patients undergoing heart surgery. *Chest* 1996; 109: 1556-1561.
- Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ Jr, Kolenbrander PE.** Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 2837- 2848.
- Didilescu A, Skaug N, Marica C, Didilescu C.** Respiratory pathogens in dental plaque of hospitalized patients with chronic lung diseases. *Clin Oral Invest* 2005; 9: 141-147.
- Dige I, Nilsson H, Kilian M, Nyvad B.** In situ identification of streptococci and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence in situ hybridization. *Eur J Oral Sci* 2007; 115: 459-467.
- Dige I, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B.** Application of stereological principles for quantification of bacteria in intact dental biofilms. *Oral Microbiol Immun* 2009; 24: 69-75.
- Diz Dios P, Tomás Carmona I, Limeres Posse J, Medina Henríquez J, Fernández Feijoo J, Alvarez Fernández M.** Comparative efficacies of

- amoxicillin, clindamycin, and moxifloxacin in prevention of bacteremia following dental extractions. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2996-3002.
- Diz Dios P.** Infective endocarditis prophylaxis. *Oral Dis* 2014; 20: 325-328.
- Dodson T.** Prevention and treatment of dry socket. *Evid Based Dent* 2013; 14: 13-14.
- Donlan RM, Costerton JW.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167-193.
- Durum SK, Oppenheim J.** Proinflammatory cytokines and immunity. In: Paul W.E., editor. *Fundamental immunology*. New York: Raven Press Ltd 1993.
- Duval X, Delahaye F, Alla F, Tattevin P, Obadia JF, Le Moing V, Doco-Lecompte T, Celard M, Poyart C, Strady C, Chirouze C, Bes M, Cambau E, Iung B, Selton-Suty C, Hoen B.** Temporal trends in infective endocarditis in the context of prophylaxis guideline modifications: three successive population-based surveys. *J Am Coll Cardiol* 2012; 59: 1968-1976.
- Eckert R, Qi F, Yarbrough DK, He J, Anderson MH, Shi W.** Adding selectivity to antimicrobial peptides: rational design of a multidomain peptide against *Pseudomonas* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1480-1488.
- El Attar MM, Zaghloul MZ, Elmenoufi HS.** Role of periodontitis in hospital-acquired pneumonia. *East Mediterr Health J* 2010; 16: 563-569.
- El-Solh AA, Pietrantonio C, Bhat A, Okada M, Zambon J, Aquilina A, Berbary E.** Colonization of dental plaques: a reservoir of respiratory pathogens for hospital-acquired pneumonia in institutionalized elders. *Chest* 2004; 126: 1575-1582.
- Engelbrecht SP, Lamster IB, Elkind MS, Rundek T, Sermanm NJ, Demmer RT, Sacco RL, Papapanou PN, Desvarieux M.** Radiographic measures of chronic periodontitis and carotid artery plaque. *Stroke* 2005; 36: 561-566.
- Erverdi N, Acar A, Isguden B, Kadir T.** Investigation of bacteremia after orthodontic banding and debanding following chlorhexidine mouth wash application. *Angle Orthod* 2001; 71: 190-194.
- Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C, Kopp H, Rippin G, Victor A, Hafner G, Schlumberger W, Meyer J.** Impact of infectious burden on extent and long-term prognosis of atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 15-21.
- Fagon JY, Chastre J, Hance AJ, Montravers P, Novara A, Gibert C.** Nosocomial pneumonia in ventilated patients a cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay. *Am J Med* 1993; 94: 281-288.
- Featherstone JD.** Caries management by risk assessment: consensus statement. *J Calif Dent Assoc* 2002; 31: 257-269.

- Featherstone JD.** The caries balance. Contributing factors and early detection. *J Calif Dent Assoc* 2003; 31: 129-233.
- Feng W, Wu T, Sun QF, Yang PS, Liu XL.** Detection of platelet-activating factor in unstimulated mixed saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients with coronary heart disease. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2010; 19: 228-231.
- Fiehn NE, Larse T, Christiansen N, Holmstrup P, Schroeder TV.** Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. *J Periodontol* 2005; 76: 731-736.
- Field EA Nind D, Varga E, Martin MV.** The effect of chlorhexidine irrigation on the incidence of dry socket: a pilot study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1988; 26: 395-401.
- Filoché SK, Coleman MJ, Angker L, Sissons CH.** A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. *J Microbiol Meth* 2007; 69: 489-496.
- Fine DH.** Mouthrinses as adjuncts for plaque and gingivitis management. A status report for the American Journal of Dentistry. *Am J Dent* 1988; 1: 259-263.
- Foster JS, Kolenbrander PE.** Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 4340-4348.
- Foster JS, Palmer RJ Jr, Kolenbrander PE.** Human oral cavity as a model for the study of genome-genome interactions. *Bio Bull* 2003; 204: 200-204.
- Fotos PG, Koobusch GF, Sarasin DS, Kist RJ.** Evaluation of intra-alveolar chlorhexidine dressings after removal of impacted mandibular third molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73: 383-388.
- Fourrier F, Cau-Pottier E, Boutigny H, Roussel-Delvallez M, Jourdain M, Chopin C.** Effects of dental plaque antiseptic decontamination on bacterial colonization and nosocomial infections in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2000; 26: 1239-1247.
- Fourrier F, Dubois D, Pronnier P, Herbecq P, LeRoy O, Desmettre T, Pottier-cau E, Boutigny H, Di pompéo C, Durocher A, Roussel-Delvallez M; PIRAD Study Group.** Effect of gingival and dental plaque antiseptic decontamination on nosocomial infections acquired in the intensive care unit: a double-blind placebo-controlled multicenter study. *Crit Care Med* 2005; 33: 1728-1735.
- Fourrier F, Duvivier B, Boutigny H, Roussel-Delvallez M, Chopin C.** Colonization of dental plaque: a source of nosocomial infections in intensive care unit patients. *Crit Care Med* 1998; 26: 301-308.
- Franch M, Pascual A, Santos A.** Colutorios en periodoncia. Parte II. *Archivos de Odontoestomatología* 2005; 21: 471-487.

- Frandsen EG, Reinholdt J, Kilian M.** Enzymatic and antigenic characterization of immunoglobulin A1 proteases from *Bacteroides* and *Capnocytophaga* spp. *Infect Immun* 1987; 55: 631-638.
- Frías J, Alsina M.** Nuevas perspectivas en biofilms dentales. *Periodoncia* 2001; 11: 23-32.
- Frías J, Olle E, Alsina M.** periodontal pathogens produce *quorum sensing* signal molecules. *Infect Immun* 2001; 69: 3431-3434.
- García Murcia MJ, Peñarrocha Diago M.** Alveolitis seca: Revisión de la literatura y metanálisis. *Rev Act Odontoestomatol Esp* 1994; 44: 25-34.
- García-Caballero L, Quintás V, Prada-López I, Seoane J, Donos N, Tomas I.** Chlorhexidine substantivity on salivary flora and plaque-like biofilm: *ab in situ* model. *PLoS One* 2013; 8: e83522.
- García-Caballero L.** Evaluación *in vivo* de la sustantividad de la clorhexidina al 0,2% en diferentes ecosistema orales. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 2012.
- Gastinne H, Wolff M, Delatour F, Faurisson F, Chevret S.** A controlled trial in intensive care units of selective decontamination of the digestive tract with nonabsorbable antibiotics. The French Study Group on Selective Decontamination of the Digestive Tract. *N Engl J Med* 1992; 326:594-599.
- Geismar K, Stoltze K, Sigurd B, Gyntelberg F, Holmstrup P.** Periodontal disease and coronary heart disease. *J Periodontol* 2006; 77: 1547-1554.
- Genuit T, Bochicchio G, Napolitano LM, McCarter RJ, Roghman MC.** Prophylactic chlorhexidine oral rinse decreases ventilator-associated pneumonia in surgical ICU patients. *Surg Infect* 2001; 2: 5-18.
- Gianfaldoni C, Maccari S, Pancotto L, Rossi G, Hilleringmann M, Pansegrau W, Sinisi A, Moschioni M, Masignani V, Rappuoli R, Del Giudice G, Ruggiero P.** Sortase A confers protection against *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infect Immun* 2009; 77: 2957-2961.
- Gilbert P, Das J, Foley I.** Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 1997; 11: 160-167.
- Gilbert P, Maira-Litran T, McBain AJ, Rickard AH, Whyte FW.** The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol* 2002; 46: 202-256.
- Glenny AM, Oliver R, Roberts GJ, Hooper L, Worthington HV.** Antibiotics for the prophylaxis of bacterial endocarditis in dentistry. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 10: CD003813.
- Goldstein EJ, Kirby BD, Finegold SM.** Isolation of *Eikenella corrodens* from pulmonary infections. *Am Rev Resp Dis* 1979; 119: 55-58.
- Gotsman I, Lotan C, Soskolne WA, Rassevsky S, Pugatsch T, Lapidus L, Novikov Y, Masrawa S, Stobholz A.** Periodontal destruction is associated

with coronary artery disease and periodontal infection with acute coronary syndrome. *J Periodontol* 2007; 78: 849-858.

Gould FK, Elliot TSJ, Foweraker J, Fulford M, Perry JD, Roberts GJ, Sandoe JA, Watkin RW, Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. Guidelines for the prevention of endocarditis: report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 1035-1042.

Grabczewska Z, Nartowicz E, Kubica J, Rooec D. Endothelial function parameters in patients with unstable angina and infection with *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae*. *Eur J Int Med* 2006; 17: 339-342.

Grap MJ, Munro CL, Hamilton VA, Elswick RJ, Sessler CN, Ward KR. Early, single chlorhexidine application reduces ventilator-associated pneumonia in trauma patients. *Heart Lung* 2011; 40: 115-122.

Grau AJ, Becher H, Ziegler CM, Lichy C, Buggle F, Kaiser C, Lutz R, Bültmann S, Preusch M, Dörfer CE. Periodontal disease as a risk factor for ischemic stroke. *Stroke* 2004; 35: 496-501.

Gu F, Lux R, Du-Thumm L, Stokes I, Kreth J, Anderson MH, Wong DT, Wolinsky L, Sullivan R, Shi W. In situ and noninvasive detection of specific bacterial species in oral biofilms using fluorescently labeled monoclonal antibodies. *J Microbiol Meth* 2005; 62: 145-160.

Gu H, Fan D, Gao J, Zou W, Peng Z. Effect of ZnCl₂ on plaque growth and biofilm vitality. *Arch Oral Biol* 2012; 57: 369-375.

Guggenheim B, Giertsen E, Schüpbach P, Shapiro S. Validation of an *in vitro* biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* 2001; 80: 363-370.

Guggenheim B, Meier A. *In vitro* effect of chlorhexidine mouth rinses on polyspecies biofilms. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2011; 121: 432-441.

Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I, Moreillon P, de Jesus Antunes M, Thilen U, Lekakis J, Lengyel M, Müller L, Naber CK, Nihoyannopoulos P, Moritz A, Zamorano JL; ESC Committee for Practice Guidelines. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis: the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2009; 30: 2369-2413.

Hagiwara N, Toyoda K, Inoue T, Shimada H, Ibayashi S, Iida M, Okada Y. Lack of association between infectious burden and carotid atherosclerosis in Japanese patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2007; 16: 145-152.

Hakansson A, Carlstedt I, Davies J, Mossberg AK, Sabharwal H, Svanborg C. Aspects on the interaction of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* with human respiratory tract mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 187-191.

- Halpern LR, Dodson TB.** Does prophylactic administration of systemic antibiotics prevent postoperative inflammatory complications after third molar surgery? *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65: 177-185.
- Hammond JM, Potgieter PD, Saunders GL, Forder AA.** Double-blind study of selective decontamination of the digestive tract in intensive care. *Lancet* 1992; 340: 5-9.
- Handley PS, Sutton NA, Hughes N.** Problems associated with electron microscopy of biofilms. In: Bacterial biofilms and their control in medicine and industry. Wimpenny J, Nichols W, Stickler D, Lappin-Scott H (eds). Cardiff: Bioline, Cardiff, 1993: 61-66.
- Hannig C, Hannig M, Rehmer O, Braun G, Hellwig E, Al-Ahmad A.** Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel *in situ*. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 1048-1056.
- Hannig C, Hannig M.** The oral cavity-a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Invest* 2009; 13: 123-139.
- Hannig M.** Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials *in vivo*. *Eur J Oral Sci* 1999; 107: 55-64.
- Haraji A, Rakhshan V, khamverdi N, Alishahi HK.** Effects of intra-alveolar placement of 0,2% chlorhexidine bioadhesive gel on dry socket incidente and postsurgical pain: a double-blind splits-mouth randomized controlled clinical trial. *J Orofac Pain* 2013; 27: 256-262.
- Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zed J, Genco RJ.** Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol* 2000; 71: 1554-1560.
- Hayes C, Sparrow D, Cohen M, Vokonas PS, García RI.** The association between alveolar bone loss and pulmonary function: the VA Dental Longitudinal Study. *Ann Periodontol* 1998; 3: 257-261.
- He J, Anderson MH, Shi W, Eckert R.** Design and activity of a dual-targeted antimicrobial peptide. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33: 532-537.
- He Y, Peterson BW, Jongsma MA, Ren Y, Sharma PK, Busscher HJ, van der Mei HC.** Stress relaxation analysis facilitates a quantitative approach towards antimicrobial penetration into biofilms. *PloS One* 2013; 8: e63750.
- Hedström L, Sjögren P.** Effect estimates and methodological quality of randomized controlled trials about prevention of alveolar osteitis following tooth extraction: a systematic review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 103: 8-15.
- Hedstrom L.** Effect of metronidazole on development of dry socket following removal of lower third molars. *Tandlakartidningen* 1990; 82: 4-8.
- Heininger A, Meyer E, Schwab F, Marschal M, Unerti K, Krueger WA.** Effects of long-term routine use of selective digestive decontamination on antimicrobial resistance. *Intensive Care Med* 2006; 32: 1569-1576.

- Hermesch CB, Hilton TJ, Biesbrock AR, Baker RA, Cain-Hamlin J, McClanahan SF, Gerlach RW.** Perioperative use of 0,12% chlorhexidine gluconate for the prevention of alveolar osteitis: efficacy and risk factor analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 381-387.
- Herzberg MC, Nobbs A, Tao L, Kilic A, Beckman E, Khammanivong A, Zhang Y.** Oral streptococci and cardiovascular disease: searching for the platelet aggregation-associated protein gene and mechanisms of *Streptococcus sanguis* induced thrombosis. *J Periodontol* 2005; 76: 2101-2105.
- Hita-Iglesias P, Torres-Lagares D, Flores-Ruiz R, Magallanes-Abad N, Basallote-González M, Gutiérrez-Pérez JL.** Effectiveness of chlorhexidine gel versus chlorhexidine rinse in reducing alveolar osteitis in mandibular tirad molar surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66: 441-445.
- Honda T, Oda T, Yoshie H, Yamazaki K.** Effects of *Porphyromonas gingivalis* antigens and proinflammatory cytokines on human coronary artery endothelial cells. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 82-88.
- Hope CK, Clements D, Wilson M.** Determining the spatial distribution of viable and nonviable bacteria in hydrated microcosm dental plaques by viability profiling. *J Appl Microbiol* 2002; 93: 448-455.
- Hope CK, Wilson M.** Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1461- 1468.
- Horstkotte D, Follath F, Gutschik E, Lengyel M, Oto A, Pavie A, Soler-Soler J, Thiene G, von Graevenitz A, Priori SG, García MA, Blanc JJ, Budaj A, Cowie M, Dean V, Deckers J, Fernández Burgos E, Lekakis J, Lindahl B, Mazzotta G, Morais J, Oto A, Smiseth OA, Lekakis J, Vahanian A, Delahaye F, Parkhomenko A, Filipatos G, Aldershville J, Vardas P; Task Force Members on Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology, ESC Committee for Practice Guidelines (CPG) and Document Reviewers.** Guidelines on prevention, diagnosis and treatment of infective endocarditis executive summary: the Task Force on Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2004; 25: 267-276
- Houston¹ JP, McCollum J, Pietz D, Schneck D.** Alveolar osteitis: a review of its etiology, prevention, and treatment modalities. *Gen Dent* 2002; 50: 457-463.
- Houston² S, Hougland P, Anderson JJ, LaRocco M, Kennedy V, Gentry LO.** Effectiveness of 0.12% chlorhexidine gluconate oral rinse in reducing prevalence of nosocomial pneumonia in patients undergoing heart surgery. *Am J Crit Care* 2002; 11: 567-570.
- Igarashi T.** Deletion in sortase gene of *Streptococcus mutans* Ingbritt. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 210-213.

- Isla A, Canut A, Rodríguez-Gascón A, Planells P, Beltrí-Orta P, Salmerón-Escobar JJ, Labora A, Pedraz JL.** Antibiotic therapy in odontogenic infections in children and adolescents: pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26: 621-628.
- Jafaar N, Nor GM.** The prevalence of post-extraction complications in an outpatient dental clinic in Kuala Lumpur Malaysia-a retrospective survey. *Singapore Dent J* 2000; 23: 24-28.
- Jayaraman A, Wood TK.** Bacterial *quorum sensing*: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annu Rev Biomed Eng* 2008; 10: 145-167.
- Jentsch H, Hombach A, Beetke E, Jonas L.** Quantitative transmission electron microscopic study of dental plaque-an in vivo study with different mouthrinses. *Ultrastruct Pathol* 2002; 26: 309-313.
- Jentsch H, Mozaffari E, Jonas L.** Scanning electron microscopy of growing dental plaque: a quantitative study with different mouth rinses. *Ultrastruct Pathol* 2013; 37: 233-240.
- Jha HC, Vardhan H, Gupta R, Varma R, Prasad J, Mittal A.** Higher incidence of persistent chronic infection of *Chlamydia pneumonia* among coronary artery disease patients in India is a cause of concern. *Biomed Cent Infect Dis* 2007; 30: 48.
- Johanson WG, Higuchi JH, Chaudhuri TR, Woods DE.** Bacterial adherence to epithelial cells in bacillary colonization of the respiratory tract. *Am Rev Resp Dis* 1980; 121: 55-63.
- Johanson WG, Pierce AK, Sanford AK, Thomas JP.** Nosocomial respiratory infections with gram-negative bacilli: the significance of colonization of the respiratory tract. *Ann Inter Med* 1972; 77: 701-706.
- Jonsson IM, Mazmanian SK, Schneewind O, Bremell T, Tarkowski A.** The role of *Staphylococcus aureus* sortase A and sortase B in murine arthritis. *Microbes Infect* 2003; 5: 775-780.
- Joshi N, O'Bryan T, Appelbaum PC.** Pleuropulmonary infections caused by *Eikenella corrodens*. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 1207-1212.
- Jung DJ, Al-Ahmad A, Follo M, Spitzmüller B, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C.** Visualization of initial bacterial colonization on dentine and enamel in situ. *J Microbiol Meth* 2010; 81: 166-174.
- Kaczmarzyk T, Wichlinski J, Stypulkowska J, Zaleska M, Panas M, Woron J.** Single-dose and multi-dose clindamycin therapy fails to demonstrate efficacy in preventing infectious and inflammatory complications in third molar surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007; 36: 417-422.
- Kage A, Bernimoulin JP.** 4th European symposium on the application of saliva in clinical practice and research. *Eur J Oral Sci* 1995; 103: S1-S41.
- Kaperonis EA, Liapis CD, Kakisis JD, Perrea D, Kostakis AG, Karayannakos PE.** The association of carotid plaque inflammation and

- Chlamydia pneumoniae* infection with cerebrovascular symptomatology. *J Vasc Surg* 2006; 44: 1198-1204.
- Karchmer AW.** Prosthetic valve endocarditis: a continuing challenge for infection control. *J Hosp Infect* 1991; 18: 355-366.
- Kaufmann GF, Sartorio R, Lee SH, Mee JM, Altobelli LJ 3rd, Kujawa DP, Jeffries E, Clapham B, Meijler MM, Janda KD.** Antibody interference of N-acyl-homoserine lactone-mediated bacteria quorum sensing. *J Am Chem Soc* 2006; 128: 2802-2803.
- Kawaguchi T, Decho AW.** In situ microspatial imaging using two-photon and confocal laser scanning microscopy of bacteria and extracellular polymeric secretions (EPS) within marine stromatolites. *Mar Biotechnol* 2002; 4: 127-131.
- Kay LW.** Investigations into the nature of pericoronitis. *Br J Oral Surg* 1966; 3: 188-205.
- Khair OA, Davies RJ, Devalia JL.** Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells. *Eur Resp J* 1996; 9: 1913-1922.
- Kim SW, Chang IM, Oh KB.** Inhibition of the bacterial surface protein anchoring transpeptidase sortase by medicinal plants. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66: 2751-2754.
- Kinane DF.** Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000 2000; 25: 8-20.
- Kinniment SL, Wimpenny JW, Adams D, Marsh PD.** The effect of chlorhexidine on defined, mixed culture oral biofilms grown in a novel model system. *J Appl Bacteriol* 1996; 81: 120-125.
- Kodovazenitis G, Pitsavos C, Papadimitriou L, Deliargyris EN, Vrotsos I, Stefanadis C, Madianos PN.** Periodontal disease is associated with higher levels of C-reactive protein in non-diabetic, non-smoking acute myocardial infarction patients. *J Dent* 2011; 39: 849-854.
- Koeman M, van der Ven AJ, Hak E, Joore HC, Kaasjager K, De Smet AG, Ramsay G, Dormans TP, Aarts LP, de Bel EE, Hustinx WN, Van der Tweel I, Hoepelman AM, Bonten MJ.** Oral decontamination with chlorhexidine reduces the incidence of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 1348-1355.
- Kola A, Gastmeier P.** Efficacy of oral chlorhexidine in preventing lower respiratory tract infections: meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hosp Infect* 2007; 66: 207-216.
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ Jr.** Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66: 486-505.
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Kazmerzak K, Wu R, Palmer RJ Jr.** Spatial organization of oral bacteria in biofilms. *Methods Enzymol* 1999; 310: 322-332.

- Kolenbrander PE, Eglund PG, Díaz PI, Palmer RJ Jr.** Genome-genome interactions: bacterial communities in initial dental plaque. *Trends Microbiol* 2005; 13: 11-15.
- Kolenbrander PE.** Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 413-437.
- Kolokythas A, Olech E, Miloro M.** Alveolar Osteitis: A comprehensive review of concepts and controversies. *Int J Dent* 2010; 2010: 249073.
- Konishi N, Torii Y, Kurosaki A, Takatsuka T, Itota T, Yoshiyama M.** Confocal laser scanning microscopic analysis of early plaque formed on resin composite and human enamel. *J Oral Rehabil* 2003; 30: 790-795.
- Koo H, Nino de Guzman P, Schobel BD, Vacca Smith AV, Bowen WH.** Influence of cranberry juice on glucan-mediated processes involved in *Streptococcus mutans* biofilm development. *Caries Res* 2006; 40: 20-27.
- Kornman KS, Page RC, Tonetti MS.** The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000* 1997; 14: 33-53.
- Kornman KS.** Topical Antimicrobial Agents: Individual Drug. In: Newman MG and Kornman RS. Antibiotic and Antimicrobial Use in Dental practice. Chicago: *Quintessence*, 1990: 98-109.
- Kozarov E, Sweier D, Shelburne C, Progulske-Fox A, Lopatin D.** Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. *Microbes Infect* 2006; 8: 687-693.
- Krekmanov L, Hallander HO.** Relationship between bacterial contamination and alveolitis after third molar surgery. *Int J Oral Surg* 1980; 9: 274-280.
- Krekmanov L, Nordenram A.** Postoperative complications after surgical removal of mandibular third molars. Effects of penicillin V and chlorhexidine. *Int J Oral Maxillofac surg* 1986; 15: 25-29.
- Krekmanov L.** Alveolitis after operative removal of third molars in the mandible. *Int J Oral Surg* 1981; 10: 173-179.
- Krueger WA, Lenhart FP, Neeser G, Ruckdeschel G, Schreckhase H, Eissner HJ, Forst H, Eckart J, Peter K, Unertl KE.** Influence of combined intravenous and topical antibiotic prophylaxis on the incidence of infections, organ dysfunctions, and mortality in critically ill surgical patients: a prospective, stratified, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1029-1037.
- Lacasa JM, Jiménez JA, Ferrás V, Bossom M, Sóla-Morales O, García-Rey C, Aguilar L, Garau J.** Prophylaxis versus pre-emptive treatment for infective and inflammatory complications of surgical third molar removal: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial with sustained release amoxicillin/clavulanic acid (1000/62.5 mg). *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007; 36: 321-327.

- Laird WR, Stenhouse D, Macfarlane TW.** Control of post-operative infection. A comparative evaluation of clindamycin and phenoxymethylpenicillin. *Br Dent J* 1972; 133: 106-109.
- Landa AS, van der Mei HC, Busscher HJ.** Detachment of linking film bacteria from enamel surfaces by oral rinses and penetration of sodium lauryl sulphate through an artificial oral biofilm. *Adv Dent Res* 1997; 11: 528-538.
- Lang NP, Brex M.** Chlorhexidine digluconate: an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *Periodont Res* 1986; 21: 74-89.
- Langmore SE, Terpenning MS, Schork A, Chen Y, Murray JT, Lopatin D, Loesche WJ.** Predictors of aspiration pneumonia: how important is dysphagia? *Dysphagia* 1998; 13: 69-81.
- Larsen PE.** Alveolar osteitis after surgical removal of impacted mandibular third molars. *Oral Surg Oral Med Pathol* 1992; 73: 393-397.
- Larsen PE.** The effect of a chlorhexidine rinse on the incidence of alveolar osteitis following the surgical removal of impacted mandibular third molar. *J Oral Maxillofacial Surg* 1991; 49: 932-937.
- Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE.** Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 1991; 173: 6558-6567.
- Lee, SF, McGavin MK.** Identification of a point mutation resulting in loss of cell wall anchoring activity of SrtA of *Streptococcus mutans* NG5. *Infect Immun* 2004; 72: 4314-4317.
- Legarth J.** Effect of chlorhexidine on the development of dry socket. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1977; 59: 24-26.
- Lehner T.** Analysis of one hundred cases of dry socket. *Dent Pract Dent Record* 1958; 8: 275-279.
- Leuckfeld I, Obregon-Whittle MV, Lund MB, Geiran O, Bjortuft O, Olsen I.** Severe chronic obstructive pulmonary disease: association with marginal bone loss in periodontitis. *Respir Med* 2008; 102: 488-494.
- Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG.** Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 2004; 97: 1311-1318.
- Li J, Xie D, Li A, Yue J.** Oral topical decontamination for preventing ventilator-associated pneumonia: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hosp Infect* 2013; 84: 283-293.
- Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I.** Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 547-558.
- Li YH, Huang S, Du M, bian Z, Chen Z, Fan MW.** Immunogenic characterization and protection against *Streptococcus mutans* infection induced by intranasal DNA prime-protein boost immunization. *Vaccine* 2010; 28: 5370-5376.

- Liberati A, D'Amico R, Pifferi S, Torri V, Brazzi L, Parmelli E.** Antibiotic prophylaxis to reduce respiratory tract infections and mortality in adults receiving intensive care. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 4: CD000022.
- Liébana J, Castillo AM, Álvarez M.** Periodontal diseases: microbiological considerations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004; 9: 75-82.
- Lingnau W, Berger J, Javorsky F, Fille M, Allerberger F, Benzer H.** Changing bacterial ecology during a five-year period of selective intestinal decontamination. *J Hosp Infect* 1998; 39:195-206.
- Listgarten MA, Mayo HE, Tremblay R.** Development of dental plaque on epoxy resin crowns in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol* 1975; 46: 10-26.
- Listgarten MA.** Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol* 1976; 47: 1-18.
- Little J.** The American Heart Association's guidelines for the prevention of bacterial endocarditis: a critical review. *Gen Dent* 1998; 26: 508-515.
- Liu R, Moroi M, Yamamoto M, Kubota T, Ono T, Funatsu A, Komatsu U, Tsuji T, Hara H, Nakamura M, Hirai H, Yamaguchi T.** Presence and severity of *Chlamydia pneumonia* and *Cytomegalovirus* infection in coronary plaques are associated with acute coronary syndromes. *Int Heart J* 2006; 47: 511-519.
- Lockhart PB, Blizzard J, Maslow AL, Brennan MT, Sasser H, Carew J.** Drug cost implications for antibiotic prophylaxis for dental procedures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013; 115: 345-353.
- Lockhart PB.** An analysis of bacteremias during dental extractions: a double-blind, placebo-controlled study of chlorhexidine. *Arch Inter Med* 1996; 156: 513-520.
- Lody G, Figini L, Sardella A, Carrassi A, Del Fabbro M, Furness S.** Antibiotics to prevent complications following tooth extractions. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 14: 11.
- Loesche WJ, Lopatin DE.** Interactions between periodontal disease, medical diseases and immunity in the older individual. *Periodontol 2000* 1998; 16: 80-105.
- Loesche WJ, Syed SA, Stoll J.** Trypsin-like activity in subgingival plaque. A diagnostic marker for spirochetes and periodontal disease. *J Periodontol* 1987; 58: 266-273.
- Lofthus JE, Waki MY, Jolkovsky DL, Otomo-Corgel J, Newman MG, Flemming T, Nachnani S.** Bacteremia following subgingival irrigation and scaling and root planning. *J Periodontol* 1991; 62: 602-607.
- López-Cedrún JL, Pijoan JI, Fernández S, Santamaria J, Hernandez G.** Efficacy of amoxicillin treatment in preventing postoperative complications

- in patients undergoing third molar surgery: a prospective, randomized, double-blind controlled study. *J Oral Maxillofac Surg* 2011; 69: 5-14.
- Lorenz KA, Weiss PJ.** Capnocytophageal pneumonia in a healthy man. *West J Med* 1994; 160: 79-80.
- Lund B, Edlund C, Rynnel-Dagöö B, Lundgren Y, Sterner J, Nord CE.** Ecological effects on the oro- and nasopharyngeal microflora in children after treatment of acute otitis media with cefuroxime axetil or amoxicillin-clavulanate as suspensions. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 230-237.
- Lyall JB.** Third molar surgery: the effect of primary closure, wound dressing and metronidazole on postoperative recovery. *J Royal Army Med Corps* 1991; 137: 100-103.
- Macfarlane TW, Ferguson MM, Mulgrew CJ.** Post-extraction bacteraemia: role of antiseptics and antibiotics. *Br Dent J* 1984; 156: 179-181.
- MacGregor AJ, Hart P.** The topical effect of chlorhexidine on the third molar wounds and their complications. *J Oral Surg* 1971; 29: 481-485.
- Macnaughton P, Baily J, Donlin N, Branfield P, Williams A, Rowsell H.** A randomized controlled trial assessing the efficacy of oral chlorhexidine in ventilated patients. *Intens Care Med* 2004; 30: 5-18.
- Maeda K, Nagata H, Nonaka A, Kataoka K, Tanaka M, Khizukuishi S.** Oral streptococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mediates interaction with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Microbes Infect* 2004; 6: 1163-1670.
- Maekawa T, Tabeta K, Kajita-Okui K, Nakajima T, Yamazaki K.** Increased expression of C-reactive protein gene in inflamed gingival tissues could be derived from endothelial cells stimulated with interleukin-6. *Arch Oral Biol* 2011; 56: 1312-1318.
- Maharaj B, Coovadia Y, Vayej AC.** A comparative study of amoxicillin, clindamycin and chlorhexidine in the prevention of post-extraction bacteraemia. *Cardiovasc J Afr* 2012; 23: 491-494.
- Mahomed AG, Feldman C, Smith C, Promnitz DA, Kaka S.** Does primary *Streptococcus viridans* pneumonia exist? *S Afr Med J* 1992; 82: 432-434.
- Manau-Navarro C, Guasch-Serra S.** Métodos de control de placa bacteriana. En: Cuenca E, Manau C, Serra LL. Odontología Preventiva y Comunitaria. Principios métodos y aplicaciones. Barcelona: Masson, 2005: 69-88.
- Maresso AW, Schneewind O.** Sortase as a target of anti- infective therapy. *Pharmacol Rev* 2008; 60: 128-141.
- Marik PE.** Aspiration pneumonitis and aspiration pneumonia. *N Engl Med* 2001; 344: 665-671.
- Maris P.** Modes of action of disinfectants. *Rev Sci Tech* 1995; 14: 47-55.

- Marraffini LA, Dedent AC, Schneewind O.** Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70: 192-221.
- Marrie TJ, Huang JQ.** Community-acquired pneumonia in patients receiving home care. *J Am Geriatr Soc* 2005; 53: 834-839.
- Marsh PD.** Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 2004; 38: 204-211.
- Marsh PD.** Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 7-15.
- Marsh PD.** Host defenses and microbial homeostasis: role of microbial interactions. *J Dent Res* 1989; 68: 1567-1575.
- Marsh PD.** Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994; 8: 263-271.
- Martos R, Márton I.** Correlations between dental-oral infections and cardiovascular disease. *Fogorv Sz* 2008; 101: 101-105.
- Matilla K, Vesanen M, Valtonen V, Nieminen M, Palosuo T, Rasi V, Asikainen S.** Effect of treating periodontitis on C-reactive protein levels: a pilot study. *BMC Infect Dis* 2002; 2: 30.
- Mazmanian SK, Liu G, Ton-That H, Schneewind O.** *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* 1999; 285: 760-763.
- McFarland LV.** Normal flora: diversity and functions. *Microb Ecol Health Dis* 2000; 12: 193-207.
- Mealey B.L.** Periodontal implications: medically compromised patients. *Ann Periodontol* 1996; 1: 256-321.
- Metin M, Tek M, Sener I.** Comparison of two chlorhexidine rinse protocols on the incidence of alveolar osteitis following the surgical removal of impacted third molars. *J Contemp Dent Pract* 2006; 7: 79-86.
- Meurman JH, Janket SJ, Qvarnström M, Nuutinen P.** Dental infections and serum inflammatory markers in patients with and without severe heart disease. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod* 2003; 96: 695-700.
- Millward TA, Wilson M.** The effect of chlorhexidine on *Streptococcus sanguis* biofilms. *Microbios* 1989; 58: 155-164.
- Minguez-Serra MP, Salort-Llorca C, Silvestre-Donat FJ.** Chlorhexidine in the prevention of dry socket: Effectiveness of different dosage forms and regimens. *Med Oral Patol Oral Cic Bucal* 2009; 14: 445-449.
- Miyazaki M, Babazono A, Kadowaki K, Kato M, Takata T, Une H.** Is *Helicobacter pylori* infection a risk factor for acute coronary syndromes? *J Infect* 2006; 52: 86-91.

- Mojon P, Budtz-Jorgensen E, Michel JP, Limeback H.** Oral health and history of respiratory tract infection in frail institutionalized elders. *Gerodontology* 1997; 14: 9-16.
- Monaco G, Staffolani C, Gatto MR, Checchi L.** Antibiotic therapy in impacted third molar surgery. *Eur J Oral Sc* 1999; 6: 437-441.
- Moore JW, Brekke JH.** Foreign body giant cell reaction related to placement of tetracycline-treated polylactic acid: Report of 18 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 1990; 48: 808.
- Moreillon P, Que YA.** Infective endocarditis. *Lancet* 2004; 363: 139-149.
- Morris JF, Sewell DL.** Necrotizing pneumonia caused by mixed infection with *Actinobacillus actinomycetengencomitans* and *Actinomyces israelii* – case report and review. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 450-452.
- Munro CL, Grap MJ, Sessler CN, Elswick RK Jr, Mangar D, Karlinski-Overall R, Cairn P.** Preintubation application of oral chlorhexidine does not provide additional benefit in prevention of early-onset ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2015; 147: 328-334.
- Mustapha IZ, Debrey S, Oladubu M, Ugarte R.** Cardiovascular disease markers of systemic bacterial exposure in periodontal disease and risk: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 2007; 78: 2289-2302.
- Nakamura M, Slots J.** Origin and relationship to periodontal disease. *J Periodontal Res* 1983; 18: 559-569.
- Nakano K, Inaba H, Normura R, Nemoto H, Takeda M, Yoshioka H, Matsue H, Takahashi T, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T.** Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3313-3317.
- Nakano K, Inaba H, Normura R, Nemoto H, Tamura K, Miyamoto E, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T.** Detection and serotype distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in cardiovascular specimens from Japanese patients. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 136-139.
- Nakano K, Nomura R, Shimizu N, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T.** Development of a PCR method for rapid identification of new *Streptococcus mutans* serotype k strains. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4925-4930.
- Nakib SA, Pankow JS, Beck JD, Offenbacher S, Evans GW, Desvarierux M, Folsom AR.** Periodontitis and coronary artery calcifications: the Atherosclerosis risk in Communities (ARIC) study. *J Periodontol* 2004; 75: 505-510.
- National Center for Health Statistics.** Fact sheet for chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Available at: <http://www.cdc.gov/nchs/fastats/copd.htm> (acceso, octubre 2014).

- National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE).** Prophylaxis against infective endocarditis: antimicrobial prophylaxis against infective endocarditis in adults and children undergoing interventional procedures. NICE Clinical Guideline No 64. London: National Institute for Health and Clinical Excellence, 2008.
- Netuschil L, Reich E, Unteregger G, Sculean A, Brex M.** A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 277-285.
- Netuschil L, Weiger R, Preisler R, Brex M.** Plaque bacteria counts and vitality during chlorhexidine, meridol and listerine mouthrinses. *Eur J Oral Sci* 1995; 103: 355-361.
- Netuschil L.** Staining of plaque microorganisms with Fluorescein diacetate and Ethidium bromide. *Dtsch Zahnärztl Z* 1983; 38: 914-917.
- Nicolosi LN, del Carmen Rubio M, Martinez CD, González NN, Cruz ME.** Effect of oral hygiene and 0,12 % chlorhexidine gluconate oral rinse in preventing ventilator-associated pneumonia after cardiovascular surgery. *Respir Care* 2014; 59: 504-509.
- Nobbs AH, Lamount RJ, Jenkinson H.** *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009; 73: 407-505.
- Nomura R, Nakano K, Nemoto H, Fujita K, Inagaki S, Takahashi T, Taniguchi K, Takeda M, Yoshioka H, Amano A, Ooshima T.** Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* in heart valve and dental plaque specimens from a patient with infective endocarditis. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1135-1140.
- Nonnenmacher C, Stelzel M, Susin C, Sattler AM, Schaefer JR, Maisch B, Mutters R, Flores-de-Jacoby L.** Periodontal microbiota in patients with coronary artery disease measured by real-time polymerase chain reaction: a case-control study. *J Periodontol* 2007; 78: 1724-1730.
- Nusair YM, Abu Younis MH.** Prevalence, clinical picture, and risk factors of dry socket in a Jordanian dental Teaching Center. *J Contemporary Dent Prac* 2007; 8: 53-63.
- Nyström-Rosander C, Edvinsson M, Thelin S, Hjelm E, Friman G.** *Chlamydophila pneumoniae*: specific mRNA in aorta ascendens in patients undergoing coronary artery by-pass grafting. *Scand J Infect Dis* 2006; 38: 758-763.
- Oginni FO, Fatusi OA, Alagbe AO.** A clinical evaluation of dry socket in a Nigerian teaching hospital. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61: 871-876.
- Oliveira FJ, Vieira RW, Coelho OR, Petrucci O, Oliveira PP, Antunes N, Oliveira IP, Antunes E.** Systemic inflammation caused by chronic periodontitis in patients victims of acute ischemic heart attack. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2010; 25: 51-58

- Özçaka Ö, Basoglu ÖK, Buduneli N, Tasbakan MS, Bacakoglu F, Kinane DF.** Chlorhexidine decreases the risk of ventilator-associated pneumonia in intensive care unit patients: a randomized clinical trial. *J Periodontal Res* 2012; 47: 584-592.
- Paju S, Scannapieco A.** Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Dis* 2007; 16: 508-512.
- Pallasch TJ.** Antibiotic prophylaxis: problems in paradise. *Dent Clin N Am* 2003; 47: 665-679.
- Palmer RJ Jr, Diaz PI, Kolenbrander PE.** Rapid succession within the Veillonella population of a developing human oral biofilm *in situ*. *J Bacteriol* 2006; 188: 4117-4124.
- Palmer RJ Jr, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE.** Coaggregation-mediated interactions of *streptococci* and *actinomyces* detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol* 2003; 185: 3400-3409.
- Palmer RJ Jr, Wu R, Gordon S, Bloomquist CG, Liljemark WF, Kilian M, Kolenbrander PE.** Retrieval of biofilms from the oral cavity. *Methods Enzymol* 2001; 337: 393-403.
- Pan HB, Chen H, Zhou N, Jin D, Zhang J, Peng CM.** Relationship between periodontitis and levels of high-sensitivity C-reactive protein. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2010; 28: 382-386.
- Pan JC, Ren DC.** Quorum sensing inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Patents* 2009; 19: 1581-1601.
- Panchabhai T, Dangayach N, Krishnan A, Kothari V, Karnad D.** Chlorhexidine for prevention of nosocomial pneumonia in critically ill patients. *Chest* 2009; 135: 1150-1156.
- Paramonova E, de Jong ED, Krom BP, van der Mei HC, Busscher HJ, sharma PK.** Low-load compression testing: a novel way of measuring biofilm thickness. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 7023-7028.
- Park JH, Lee JK, Um HS, Chang BS, Lee SY.** A periodontitis-associated multispecies model of an oral biofilm. *J Periodontal Implant Sci* 2014; 44: 79-84.
- Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE.** The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000* 2006; 42: 80-87.
- Peñarrocha M, Sanchos JM, Saéz U, Gay C, Bagán JV.** Oral hygiene and postoperative pain after mandibular tirad molar surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod* 2001; 92: 260-264.
- Perez Davidi M, Beyth M, Sterer N, Feuerstein O, Weiss EI.** Effect of liquid-polish coating on *in vivo* biofilm accumulation on provisional restorations: Part 1. *Quintessence Int* 2007; 38: 591-596.

- Persson GR, Ohlsson O, Pettersson T, Renvert S.** Chronic periodontitis, a significant relationship with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2003; 24: 2108-2115.
- Persson RE, Hollender LG, Powell VL, MacEntee M, Wyatt CC, Kiyak HA, Persson GR.** Assessment of periodontal conditions and systemic disease in older subjects. II. Focus on cardiovascular diseases. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 803-810.
- Piechowski-Józwiak B, Mickielewicz A, Gociong Z, Bernt H, Kwieciński H.** Elevated levels of anti-*Chlamydia pneumonia* Ig A and IgG antibodies in young adults with ischemic stroke. *Acta Neurol Scand* 2007; 116: 144-149.
- Pineda LA, Saliba RG, El Solh AA.** Effect of oral decontamination with chlorhexidine on the incidence of nosocomial pneumonia: a meta-analysis. *Crit Care* 2006; 10: R35.
- Pitiriga V, Lekakis J, Kotsis V, Protogerou A, Ikonomidis I, Gennimata V, Zakopoulos N.** Arterial stiffness and *Chlamydia pneumonia* infection in coronary artery disease. Is there a link? *Scand Cardiovasc J* 2006; 40: 285-290.
- Plummer C, Douglas CW.** Relationship between the ability of oral streptococci to interact with platelet glycoprotein Ib/alpha and with the salivary low-molecular-weight mucin, MG2. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 48: 390-399.
- Poeschl PW, Eckel D, Poeschl E.** Postoperative prophylactic antibiotic treatment in third molar surgery—a necessity? *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 3-9.
- Prada-López I, Quintás V, Donos N, Suárez-Quintanilla D, Tomás I.** Characteristics of in situ oral biofilm after 2 and 4 days of evolution. *Quintessence Int* 2015b; 46: 287-298.
- Prada-López I, Quintás V, Tomás I.** The intraoral device of overlaid disk-holding splints as a new in situ oral biofilm model. *J Clin Exp Dent* 2015a; 7: 126-132.
- Prates RA, Yamada AM Jr, Suzuki LC, Eiko Hashimoto MC, Cai S, Gouw-Soares s, Gomes L, Ribeiro MS.** Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Photochem Photobiol B* 2007; 86: 70-76.
- Pratten J, Barnett P, Wilson M.** Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms of oral bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 3515-3519.
- Pratten J, Wilson M.** Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaques supplemented with sucrose. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1595-1599.
- Presterl E, Grisold AJ, Reichamnn S, Hirschl AM, Georgopoulos A, Graninger W.** Viridans streptococci in endocarditis and neutropenic sepsis:

- biofilm formation and effects of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 45-50.
- Pucar A, Milasin J, Lekovic V, Vukadinovic M, Ristic M, Putnik S, Kenney E.** Correlation between atherosclerosis and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries. *J Periodontol* 2007; 78: 677-682.
- Pugin J, Auckenthaler R, Lew DP, Suter PM.** Oropharyngeal decontamination decreases incidence of ventilator-associated pneumonia. A randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *JAMA* 1991; 265: 2704-2710.
- Pussinen PJ, Alfthan G, Jousilahti P, Paju S, Tuomilehto J.** Systemic exposure to *Porphyromonas gingivalis* predicts incident stroke. *Atherosclerosis* 2007a; 193: 222-228.
- Pussinen PJ, Alfthan G, Rissanen H, Reunanen A, Asikainen S, Knekt P.** Antibodies to periodontal pathogens and stroke risk. *Stroke* 2004a; 35: 2020-2023.
- Pussinen PJ, Alfthan G, Tuomilehto J, Asikainen S, Jousilahti P.** High serum antibody levels to *Porphyromonas gingivalis* predict myocardial infarction. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2004b; 11: 408-415.
- Pussinen PJ, Nyssönen K, Alfthan G, Salonen R, Laukkanen JA, Salonen JT.** Serum antibody levels to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* predict the risk for coronary heart disease. *Arterioscler ThrombVasc Biol* 2005; 25: 833-838.
- Pussinen PJ, Tuomisto K, Jousilahti P, Havulinna AS, Sundvall J, Salomaa V.** Endotoxemia, immune response to periodontal pathogens, and systemic inflammation associate with incident cardiovascular disease events. *Arterioscler ThrombVasc Biol* 2007b; 27: 1433-1439.
- Quintás V, Prada-López I, Donod N, Suárez-Quintanilla D, Tomás I.** Antiplatelet effect of essential oils and 0.2% chlorhexidine on an in situ model of oral biofilm growth: a randomised clinical trial. *PLoS One* 2015b; 10: e 0117177.
- Quintás V, Prada-López I, Prados-Frutos J, Tomás I.** In situ antimicrobial activity on oral biofilm: essential oils vs. 0.2% chlorhexidine. *Clin Oral Invest* 2015a; 19: 97-107.
- Ragno JR Jr, Szkutnik AJ.** Evaluation of 0.12% chlorhexidine rinse on the prevention of alveolar osteitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 72: 524-526.
- Rahn R, Schneider S, Diehl O, Schäfer V, Shah PM.** Preventing posttreatment bacteremia: comparing topical povidone-iodine and chlorhexidine. *J Am Dent Assoc* 1995; 126: 1145-1148.
- Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ.** Prevalence of β -lactamase-producing bacteria in human periodontitis. *J Periodontol Res* 2013; 48: 493-499.

- Rech RL, Nurkin N, da Cruz I, Sostizzo F, Baião C, Perrone JA, Wainstein R, Pretto D, Manenti ER, Bodanese LC.** Association between periodontal disease and acute coronary syndrome. *Arq Bras Cardiol* 2007; 88: 185-190.
- Reddi K, Wilson M, Nair S, Poole S, Henderson B.** Comparison of the pro-inflammatory cytokine-stimulating activity of the surface-associated proteins of periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res* 1996; 31: 120-130.
- Reddy MS, Murphy TF, Bernstein JM.** Middle ear mucin glycoprotein: purification and interaction with nontypable *Haemophilus influenza* and *Moraxella catarrhalis*. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 116: 175-180.
- Renvert S, Ohlsson O, Pettersson T, Persson GR.** Periodontitis: a future risk of acute coronary syndrome? A follow-up study over 3 years. *J Periodontol* 2010; 87: 992-1000.
- Renvert S, Pettersson T, Ohlsson O, Persson GR.** Bacterial profile and burden of periodontal infection in subjects with a diagnosis of acute coronary syndrome. *J Periodontol* 2006; 77: 1110-1119.
- Richards D.** Does chlorhexidine prevent dry socket? *Evid Based Dent* 2012; 13: 91.
- Ritzau M, Hillerup S, Branebjerg PE, Ersbol BK.** Does metronidazole prevent alveolitis sicca dolorosa? A doubleblind, placebo-controlled clinical study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1992; 21: 299-302.
- Roberts SK, Bass C, Brading M, Lappin-Scott H, Stoodley P.** Biofilm formation and structure; What's new? In: Newman HN WM, editor. Dental plaque revisited-oral biofilms in health and disease. Cardiff: BioLine 1999: 1-36.
- Robinson C, Kirkham J, Percival R, Shore RC, Bonass WA, Brookes SJ, Kusa L, Nakagaki H, Kato K, Nattress B.** A method for the quantitative site-specific study of the biochemistry within dental plaque biofilms formed *in vivo*. *Caries Res* 1997; 31: 194-200.
- Robinson C, Strafford S, Rees G, Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, Watson PS, Wood S.** Plaque biofilms: the effect of chemical environment on natural human plaque biofilm architecture. *Arch Oral Biol* 2006; 51: 1006-1014.
- Rocha LA, Martín MJ, Pita S, Paz J, Seco C, Margusino L, Villanueva R, Durán MT.** Prevention of nosocomial infection in critically ill patients by selective decontamination of the digestive tract. A randomized, double blind, placebo-controlled study. *Intensive Care Med* 1992; 18: 398-404.
- Rodríguez-Pérez M, Bravo-Pérez M, Sánchez López JD, Muñoz-Soto E, Romero-Olíd MN, Baca-García P.** Effectiveness of 1% versus 0,2% chlorhexidine gels in reducing alveolar osteitis from mandibular tirad molar surgery: a randomized, double-blind clinical trial. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; 18: 693-700.
- Rood JP, Murgatroyd J.** Metronidazole in the prevention of "dry socket". *Br J Oral Surg* 1979; 17: 62-7

- Rozen R, Bachrach G, Zachs B, Steinberg D.** Growth rate and biofilm thickness of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans* on hydroxapatite. *APMIS* 2001; 109: 155-160.
- Rud J.** Removal of impacted lower third molars with acute pericoronaritis and necrotising gingivitis. *Br J Oral Surg* 1970; 7: 153-160.
- Russell SL, Boylan RJ, Kaslick RS, Scannapieco FA, Katz RV.** Respiratory pathogen colonization of the dental plaque of institutionalized elders. *Spec Care Dent* 1999; 19: 128-134.
- Sánchez MC, Liama-Palacios A, Blanc V, León R, Herrera D, Sanz M.** Structure, viability and bacterial kinetics of an *in vitro* biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodontol Res* 2011; 46: 252-260.
- Sanchis JM, Sáez U, Peñarrocha M, Gay C.** Tetracycline compound placement to prevent dry socket: a postoperative study of 200 impacted mandibular third molar. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 587-591.
- Sanders WE, Sanders CC.** Modification of normal flora by antibiotics: effects on individuals and the environment. In: New dimensions in antimicrobial therapy. Contemporary issues in infectious diseases series. Koot RK, Sande MA (eds). Churchill Livingstone, New York, 1984: 217-241.
- Scannapieco FA, Bush RB, Paju S.** Associations between periodontal disease and risk for nosocomial bacterial pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Periodontol* 2003; 8: 54-69.
- Scannapieco FA, Ho AW.** Potential associations between chronic respiratory disease and periodontal disease: analyses of National Health and Nutrition Examination Survey III. *J Periodontol* 2001; 72: 50-56.
- Scannapieco FA, Papandonatos GD, Dunford RG.** Associations between oral conditions and respiratory disease in a national sample survey population. *Ann Periodontol* 1998; 3: 251-256.
- Scannapieco FA, Stewart EM, Mylotte JM.** Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in medical intensive care patients. *Crit Care Med* 1992; 20: 740-745.
- Scannapieco FA, Yu J, Raghavendran K, Vacanti A, Owens SI, Wood K, Mylotte JM.** A randomized trial of chlorhexidine gluconate on oral bacterial pathogens in mechanically ventilated patients. *Crit Care* 2009; 13: R117
- Scannapieco FA.** Role of oral bacteria in respiratory infection. *J Periodontol* 1999; 70: 793-802.
- Scannapieco FA.** Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med* 1994; 5: 203-248.
- Schallhorn RA, Patel DN, Chandrasekar B, Mealey BL.** Periodontal disease in association with systemic levels of interleukin-18 and CXCL16 in patients undergoing cardiac catheterization. *J Periodontol* 2010; 81: 1180-1186.

- Schaudinn C, Carr G, Gorur A, Jaramillo D, Costerton JW, Webster P.** Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/CLSM-SEM). *J Microsc* 2009; 235: 124-127.
- Scheie AA, Petersen FC.** The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases? *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15: 4-12.
- Scheie AA.** Mechanisms of dental plaque formation. *Adv Dent Res* 1994; 8: 246-253.
- Segers P, Speekenbrink RG, Ubbink DT, Van Ogtrop M, De Mol BA.** Prevention of nosocomial infection in cardiac surgery by decontamination of the nasopharynx and oropharynx with chlorhexidine gluconate: A randomized controlled trial. *JAMA* 2006; 296: 2460-2466.
- Sekar R, Griebe T, Flemming HC.** Influence of image acquisition parameters on quantitative measurements of biofilms using confocal laser scanning microscopy. *Biofouling* 2002; 18: 47-56.
- Serrano J, Calsina G.** ¿Existen realmente diferencias clínicas entre las distintas concentraciones de clorhexidina?: Comparación de colutorios. *RCOE* 2005; 10: 457-464.
- Serrano-Granger J, Herrera D.** La placa dental como biofilm. ¿Cómo eliminarla? *RCOE* 2005; 10: 431-439.
- Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M.** Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod* 2011; 37: 657-661.
- Silvestri L, Weir I, Gregori D, Taylor N, Zanstra D, Van Saene JJ, van Saene HK.** Effectiveness of oral chlorhexidine on nosocomial pneumonia, causative microorganisms and mortality in critically ill patients: a systematic review and metaanalysis. *Minerva Anesthesiol* 2014; 80: 805-820.
- Simmons NA.** Dentistry and endocarditis. *Br Dent J* 1990; 169: 74-75.
- Singh A, Daing A, Dixit J.** The effect of herbal, essential oil and chlorhexidine mouthrinse on de novo plaque formation. *Int J Dent Hyg* 2013; 11: 48-52.
- Singh R, Stine OC, Smith DL, Spitznagel JK Jr, Labib ME, Williams HN.** Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 3412-3420.
- Singleton S, Treloar R, Warren P, Watson GK, Hodgson R, Allison C.** Methods for microscopic characterization of oral biofilms: analysis of colonization, microstructure, and molecular transport phenomena. *Adv Dent Res* 1997; 11: 133-149.
- Slavkin HC.** Biofilms, microbial ecology and Antoni van Leeuwenhoek. *J Am Dent Assoc* 1997; 128: 492-495.
- Slots J.** Causal or casual relationship between periodontal infection and non-oral disease. *J Dent Res* 1998; 77: 1764-1765.

- Smith KG.** Chlorhexidine gel reduces incidence of alveolar osteitis after extraction of the mandibular third molars. *Evid Based Dent* 2009; 10: 54-55.
- Socransky SS, Haffajee AD, Teles R, Wennstrom JL, Lindhe J, Bogren A, Hasturk H, van Dyke T, Wang X, Goodson JM.** Effect of periodontal therapy on the subgingival microbiota over a 2-year monitoring period. I. Overall effect and kinetics of change. *J Clin Periodontol* 2013; 40: 771-780.
- Socransky SS, Haffajee AD.** Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 2002; 28: 12-55.
- Socransky SS, Haffajee AD.** Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* 2005; 38: 135-187.
- Sorensen DC, Preisch JW.** The effect of tetracycline on the incidence of postextraction alveolar osteitis. *J Oral Maxillofac Surg* 1987; 45: 1029-1033.
- Soriano F, Rodríguez-Cerrato V.** Pharmacodynamic and kinetic basis for the selection of pneumococcal resistance in the upper respiratory tract. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 51-58.
- Sridhar V, Wali GG, Shyla HN.** Evaluation of the perioperative use of 0,2% chlorhexidine gluconate for the prevention of alveolar osteitis after the extraction of impacted mandibular third molars: a clinical study. *J Maxillofac Oral Surg* 2011; 10: 101-111.
- Step toe A, Shamaei-Tousi A, Gylfe A, Henderson B, Bergstrom S, Marmot MM.** Socioeconomic status, pathogen burden, and cardiovascular disease risk. *Heart* 2007; 93: 1567-1570.
- Stewart PS.** Diffusion in biofilms. *J Bacteriol* 2003; 185: 1485-1491.
- Stoutenbeek CP, van Saene HK, Miranda DR, Zandstra DF.** The effect of selective decontamination of the digestive tract on colonisation and infection rate in multiple trauma patients. *Intensive Care Med* 1984; 10:185-192.
- Stoutenbeek CP, van Saene HK, Miranda DR, Zanstra DF, Langrehr D.** The effect of oropharyngeal decontamination using topical nonabsorbable antibiotics on the incidence of nosocomial respiratory tract infections in multiple trauma patients. *J Trauma* 1987; 27: 357-364.
- Suwanagool S, Rothkopf MM, Smith SM, LeBlanc D, Eng R.** Pathogenicity of *Eikenella corrodens* in humans. *Arch Int Med* 1983; 143: 2265-2268.
- Swanson AE.** A double-blind study on effectiveness of tetracycline in reducing the incidence of fibrinolytic alveolitis. *J Oral Maxillofac Surg* 1989; 47: 165-167.
- Swanson AE.** Prevention of dry socket: An overview. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 70: 131-136.

- Sweet JB, Butler DP.** Predisposing and operative factors: effect on the incidence of localized osteitis in mandibular third-molar surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 46: 206-215.
- Tablan OC, Anderson LJ, Besser R, Bridges C, Hajjeh R.** Guidelines for preventing healthcare-associated pneumonia, 2003: recommendations of CDC and the Healthcare Infection. Control Practices Advisory Committee. *MMWR Recomm Res* 2004; 53: 1-36.
- Tang K, Lin M, Wu Y, Yan F.** Alterations of serum lipid and inflammatory cytokine profiles in patients with coronary heart disease and chronic periodontitis: a pilot study. *J Int Med Res* 2011; 39: 238-248.
- Tantipong H, Morkhareonpong C, Jaiyindee S, Thamlikitkul V.** Randomized controlled trial and meta-analysis of oral decontamination with 2% chlorhexidine solution for the prevention of ventilator-associated pneumonia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29: 131-136.
- Tawakoli PN, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C.** Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clin Oral Invest* 2013; 17: 841-850.
- Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS.** Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol 2000* 2006; 42:180-218.
- Ten Cate JM, Marsh PD.** Procedures for establishing efficacy of antimicrobial agents for chemotherapeutic caries prevention. *J Dent Res* 1994; 73: 695-703.
- Ten Cate JM.** Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology* 2006; 94: 1-9.
- Tenovuo J.** Antimicrobial function of human saliva--how important is it for oral health? *Acta Odontol Scand* 1998; 56: 250-256.
- Terpenning MS, Taylor GW, Lopatin DE, Kerr CK, Domínguez BL, Loesche WJ.** *J Am Geriatr Soc* 2001; 49: 557-563.
- Thornhill MH, Dayer MJ, Forde JM, Corey GR, Chu VH, Couper DJ, Lockhart PB.** Impact of the NICE guideline recommending cessation of antibiotic prophylaxis for prevention of infective endocarditis: before and after study. *BMJ* 2011; 342: d2392.
- Thornhill MH, Dayer MJ, Prendergast B, Baddour LM, Jones S, Lockhart PB.** Incidence and nature of adverse reactions to antibiotics used as endocarditis prophylaxis. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 2382-2388.
- Thurnheer T, Gmür R, Shapiro S, Guggenheim B.** Mass transport of macromolecules within an *in vitro* model of supragingival plaque. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 1702-1709.
- Tjernberg A.** Influence of oral hygiene measures on the development of alveolitis sicca dolorosa after surgical removal of mandibular third molars. *Int J Oral Surg* 1979; 8: 430-434.

- Tojo M, Yamashita N, Goldmann DA, Pier GB.** Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 1988; 157: 713-722.
- Tomás I, Álvarez M, Limeres J, Tomás M, Medina J, Otero JL, Diz P.** Effect of a chlorhexidine mouthwash on the risk of postextraction bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28: 577-582.
- Tomás I, Diz P, Tobías A, Scully C, Donos N.** Periodontal health status and bacteraemia from daily oral activities: systematic review/ meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2012; 39: 213-228.
- Tomás I, García-Caballero L, Cousido MC, Limeres J, Álvarez M, Diz P.** Evaluation of chlorhexidine substantivity on salivary flora by epifluorescence microscopy. *Oral Dis* 2009; 15: 428-433.
- Tomás I, García-Caballero L, López-Álvar E, Suárez M, Diz P, Seoane J.** *In situ* chlorhexidine substantivity on saliva and plaque-like biofilm: influence of circadian rhythm. *J Periodontol* 2013; 84: 1662-1672.
- Tomás I, Henderson B, Diz Dios P, Donos N.** *In vivo* oral biofilm analysis by confocal laser scanning microscopy: methodological approaches In: A M-V, editor. Microscopy Science, technology, applications and education. Badajoz (Spain): *Formatex* 2010: 597-606.
- Tomasz A.** Control of the competent state in *Pneumococcus* by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanisms in bacteria. *Nature* 1965; 208: 155-159.
- Torres A, Carlet J.** Ventilator-associated pneumonia. European Task Force on ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J* 2001; 17: 1034-1045.
- Torres-Lagares D, Gutierrez-Pérez JH, Hita-Iglesias P, Magallanes-Abad N, Flores-Ruiz R, Basallote-García M, González-Martín M.** Randomized, double-blind study of effectiveness of intra-alveolar application of chlorhexidine gel in reducing incidence of alveolar osteitis and bleeding complications in mandibular third molar surgery in patients with bleeding disorders. *J Oral Maxillofac Surg* 2010; 68: 1322-1326.
- Torres-Lagares D, Gutierrez-Pérez JL, Infante-Cossío P, García-Calderón M, Romero-Ruiz MM, Serrera-Figallo MA.** Randomized, double-blind study on effectiveness of intra-alveolar chlorhexidine gel in reducing the incidence of alveolar osteitis in mandibular third molar surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006; 35: 348-351.
- Torres-Lagares D, Serrera-Figallo MA, Romero-Ruiz MM, Infante-Cossío P, García-Calderón M, Gutiérrez-Pérez JL.** Update on dry socket: a review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; 10: 77-81
- Trieger N, Schlagel GD.** Preventing dry socket. A simple procedure that works. *J Am Dent Assoc* 1991; 2: 67.
- Tsirlis AT, Lakovidis DP, Parissis NA.** Dry socket: frequency of occurrence after intraligamentary anesthesia. *Quintessence Int* 1992; 23: 575-577.

- van der Mei HC, White DJ, Atema-Smit J, van de Belt-Gritter E, Busscher HJ.** A method to study sustained antimicrobial activity of rinse and dentifrice components on biofilm viability *in vivo*. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 14-20.
- van Steenberghe TJ, van Winkelhoff AJ, de Graaff J.** Pathogenic synergy: mixed infections in the oral cavity. *Antonie van Leeuwenhoek* 1984; 50: 789-798.
- Verwaest C, Verhaegen J, Ferdinande P, Schetz M, Van den Berghe G, Verbist L, Lauwers P.** Randomized, controlled trial of selective digestive decontamination in 600 mechanically ventilated patients in a multidisciplinary intensive care unit. *Crit Care Med* 1997; 25: 63-71.
- Vilkuna-Rautiainen T, Pussinen PJ, Roivainen M, Petäys T, Jousilathi P, Hovi T, Vartiainen E, Asikainen S.** Serum antibody response to periodontal pathogens and herpes simplex virus in relation to classic risk factors of cardiovascular disease. *Int J Epidemiol* 2006; 35: 1486-1494.
- Völzke H, Wolff B, Lüdemann J, Guertler L, Kramer A, John U, Felix SB.** Seropositivity for anti-Borrelia IgG antibody is independently associated with carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2006; 184: 108-112.
- von Ohle C, Gieseke A, Nistico L, Decker EM, DeBeer D, Stoodley P.** Real-time microsensor measurement of local metabolic activities in *ex vivo* dental biofilms exposed to sucrose and treated with chlorhexidine. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 2326-2334.
- Watson PS, Pontefract HA, Devine DA, Shore RC, Nattress BR, Kirkham J, Robinson C.** Penetration of fluoride into natural plaque biofilms. *J Dent Res* 2005; 84: 451-455.
- Watson TF, Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV.** *In vivo* confocal microscopy in clinical dental research: an initial appraisal. *J Dent* 1992; 20: 352-358.
- Watson TF.** Application of confocal scanning optical microscopy to dentistry. *Br Dent J* 1991; 171: 287-291.
- Wecke J, Kersten T, Madela K, Moter A, Göbel UB, Friedmann A, Bernimoulin J.** A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 191: 95-101.
- Weiger R, Decker EM, Krastl G, Brex M.** Deposition and retention of vital and dead *Streptococcus sanguinis* cells on glass surfaces in a flow-chamber system. *Arch Oral Biol* 1999; 44: 621-628.
- Weiger R, Netuschil L, von Ohle C, Brex M.** Microbial vitality of supragingival dental plaque during initial stages of experimental gingivitis in humans. *J Periodontal Res* 1995; 30: 204-209.

- Weiger R, von Ohle C, Decker EM, Axmann-Krcmar D, Netuschil L.** Vital microorganisms in early supragingival dental plaque and in stimulated human saliva. *J Periodontal Res* 1997; 32: 233-240.
- Weiss WJ, Lenoy E, Murphy T, Tardio L, Burgio P, Projan SJ, Schneewind O, Alksne L.** Effect of *srtA* and *srtB* gene expression on the virulence of *Staphylococcus aureus* in animal models of infection. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 480-486.
- Wiener J, Itokazu G, Nathan C, Kabins SA, Weinstein RA.** A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of selective digestive decontamination in a medical-surgical intensive care unit. *Clin Infect Dis* 1995; 20:861-867.
- Wikstrom M, Linde A.** Ability of oral bacteria to degrade fibronectin. *Infect Immun* 1986; 51: 707-711.
- Wilson M, Patel H, Noar JH.** Effect of chlorhexidine on multi-species biofilms. *Curr Microbiol* 1998; 36: 13-18.
- Wilson M, Reddi K, Henderson B.** Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontal Res* 1996; 31: 393-407.
- Wilson M.** Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol* 1996; 44: 79-87.
- Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Baddour LM, Levison M, Bolger A, Cabell CH, Takahashi M, Baltimore RS, Newburger JW, Strom BL, Tani LY, Gerber M, Bonow RO, Pallasch T, Shulman ST, Rowley AH, Burns JC, Ferrieri P, Gardner T, Goff D, Durack DT;** American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Clinical Cardiology; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group; American Dental Association. Prevention of infective endocarditis: guidelines from the American Heart Association: a guideline from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *J Am Dent Assoc* 2007; 138: 739-745, 747-760.
- Wimpenny J.** Biofilms: structure and organisation. *Microb Ecol Health Dis* 1995; 8: 305-308.
- Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J, Robinson C.** An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed *in vivo*. *J Photochem Photobiol B* 1999; 50: 1-7.
- Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C.** Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res* 2000; 79: 21-27.

- Wood SR, Kirkham J, Shore RC, Brookes SJ, Robinson C.** Changes in the structure and density of oral plaque biofilms with increasing plaque age. *FEMS Microbiol Ecol* 2002; 39: 239-244.
- Woods DE, Stras DC, Johanson WG, Bass JA.** Role of fibronectin in the prevention of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to buccal cells. *J Infect Dis* 1981; 143: 784-790.
- World Health Organization.** Oral health surveys, Basic methods, 4th ed. WHO: Geneva, 1997.
- Wrede C, Heller C, Reitner J, Hoppert M.** Correlative light/ electron microscopy for the investigation of microbial mats from Black Sea Cold Seeps. *J Microbiol Meth* 2008; 73: 85-91.
- Wu H, Song Z, Hentzer M, Andersen JB, Molin S, Givskov M, Hoiby N.** Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudo- monas aeruginosa* lung infection in mice. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 1054-1061.
- Yao Y, Berg EA, Costello CE, Troxler RF, Oppenheim FG.** Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *J Biol Chem* 2003; 278: 5300-5308.
- Yavuz MT, Yavuz O, Yazici M, Guler S, Ozhan H, Albayrak S, Coskun A.** Interaction between *Chlamydia pneumonia* seropositivity inflammation and risk factors for atherosclerosis in patients with severe coronary stenosis. *Scand J Clin Lab Invest* 2006; 66: 523-534.
- Yengopal V, Mickenautsch S.** Chlorhexidine for the prevention of alveolar osteitis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2012; 41: 1253-1264.
- Yoneyama T, Hashimoto K, Fukuda H, Ishida M, Arai H, Sekizama K, Yamaya M, Sasaki H.** Oral hygiene reduces respiratory infections in elderly bed-bound nursing home patients. *Arch Gerontol Geriatr* 1996; 22: 11-19.
- Yoshikawa H, Aida K, Mori A, Muto S, Fukuda T.** Involvement of *Helicobacter pylori* infection and impaired glucose metabolism in the increase of brachial-ankle pulse wave velocity. *Helicobacter* 2007; 12: 559-566.
- Younessi OJ, Walker DM, Ellis P, Dwyer DF.** Fatal *Staphylococcus aureus* infective endocarditis: dental implications. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod* 1998; 85: 168-172.
- Yuan A, Luh KT, Yang PC.** *Actinobacillus actinomicetencomitans* pneumonia with possible septic embolization. *Chest* 1994; 105: 646.
- Zambon JJ, Nakamura M, Slots J.** Effect of periodontal therapy on salivary enzyme activity. *J Periodontal Res* 1985; 20: 652-659.
- Zamora Zamora F.** Effectiveness of oral care in the prevention of ventilator-associated pneumonia. Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Enferm Clin* 2011; 21: 308-319.

- Zaremba M, Gorska R, Suwalski P, Kowalski J.** Evaluation of the incidence of periodontitis associated bacteria in the atherosclerotic plaque of coronary blood vessels. *J Periodontol* 2007; 78: 322-327.
- Zaura-Arite E, van Marle J, ten Cate JM.** Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 2001; 80: 1436-1440.
- Zhang YQ, Ren SX, Li HL, wang YX, Fu G, Yang J, Qin ZQ, Miao YG, Wang WY, Chen RS, Shen Y, Chen Z, Yuan ZH, Zhao GP, Qu D, Danchin A, Wen YM.** Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol Microbiol* 2003; 49: 1577-1593.
- Zijlstra EE, Swart GR, Godfroy FJM, Degener JE.** Pericarditis, pneumonia and brain abscess due to a combined *Actinomyces-Actinobacillus actinomicetencomitans* infection. *J Infect* 1992; 25: 83-87.
- Zou X, Wang Z, Song Y, Zhang J, Wang C.** Periodontal health and quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2011; 105: 67-73.
- Zuanazzi D, Souto R, Mattos MB, Zuanazzi MR, Tura BR, Sansone C, Colombo AP.** Prevalence of potencial bacterial respiratory pathogens in the oral cavity of hospitalized individuals. *Arch Oral Biol* 2010; 55: 21-28.
- Zuniga JR, Leist JC.** Topical tetracycline-induced neuritis: a case report. *J Oral Maxillofac Surg* 1995; 53: 196-199.



8. RESUMEN



Justificación

El biofilm oral desempeña un papel relevante en el desarrollo de infecciones locales tan prevalentes como la caries y la enfermedad periodontal, y en la aparición de la complicación infecciosa más frecuente después de una exodoncia, la alveolitis seca; además, se ha sugerido que puede participar en la etiopatogenia de infecciones focales que ocasionalmente están originadas por patógenos orales, como la endocarditis bacteriana o las neumonías asociadas a ventilación mecánica. Para prevenir estas complicaciones infecciosas se administran profilácticamente antisépticos como la clorhexidina y/o antibióticos sistémicos.

Objetivos y Metodología

Se evaluó *in situ* la actividad antimicrobiana de la clorhexidina (CHX) al 0,20% sobre las bacterias del biofilm oral, administrada en enjuagues con una posología convencional, cada 12 horas (CHX-12h), y con una nueva posología, cada 8 horas (CHX-8h). También se evaluó la eficacia de la combinación antibiótica amoxicilina-ácido clavulánico (AMX-CLV) a dosis de 500/125mg, administrada por vía oral con una posología convencional (cada 8 horas).

El grupo de estudio lo conformaron 20 voluntarios adultos, que durante 4 días portaron una férula que incorporaba unos discos de cristal sobre los que crecía un biofilm bacteriano, que denominamos biofilm de placa dental (B-PD). Al finalizar el período de formación del B-PD durante el cual se aplicaron las intervenciones profilácticas que hemos descrito, se retiraron los discos y se tiñeron con la solución de fluorescencia LIVE/DEAD®, para finalmente analizarlos mediante un microscopio Láser Confocal Espectral Leica TCS SP2, con el fin de cuantificar el grosor del B-PD, el porcentaje de vitalidad bacteriana y el área del sustrato que éste ocupaba.

Resultados

El grosor medio en μm del B-PD en condiciones basales y tras la administración de CHX-12h, CHX-8h y AMX-CLV, fue respectivamente de 20,85, 6,05, 3,74 y 20,85. Los regímenes de CHX-12h y CHX-8h demostraron una reducción significativa del grosor del B-PD con respecto al basal y al régimen AMX-CLV ($p < 0,001$ en ambos casos). El porcentaje medio de vitalidad bacteriana del B-PD en condiciones basales y tras la administración de CHX-12h, CHX-8h y AMX-CLV, fue respectivamente de 49,13, 13,65, 1,98 y 56,64. Los regímenes de CHX-12h y CHX-8h demostraron una reducción significativa de la vitalidad bacteriana del B-PD con respecto al basal y al régimen AMX-CLV ($p < 0,001$ en ambos casos). El porcentaje medio de la superficie del sustrato ocupada por el B-PD en condiciones basales y tras la administración de CHX-12h, CHX-8h y AMX-CLV, fue respectivamente de 78,64, 21,14, 10,83 y 67,88. Los regímenes de CHX-12h y CHX-8h demostraron una reducción significativa de la superficie del sustrato ocupada por el B-PD con respecto al basal y al régimen AMX-CLV ($p < 0,001$ en ambos casos).

Conclusiones

La CHX al 0,20% administrada en enjuagues sobre un B-PD, es eficaz en términos de reducción del grosor del biofilm, del porcentaje de vitalidad bacteriana y de la superficie del sustrato que éste recubre, tanto si se administra cada 12 horas como cada 8 horas. Por el contrario, la administración de AMX-CLV por vía enteral no tiene ninguna repercusión sobre las variables del B-PD que hemos analizado.